



HAL
open science

Les bactériocines RumC, une nouvelle famille de peptides antimicrobiens comme alternative aux antibiotiques conventionnels

Steve Chiumento

► **To cite this version:**

Steve Chiumento. Les bactériocines RumC, une nouvelle famille de peptides antimicrobiens comme alternative aux antibiotiques conventionnels. Biochimie [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT : 2019GREAV018 . tel-02413219

HAL Id: tel-02413219

<https://theses.hal.science/tel-02413219v1>

Submitted on 16 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par **Steve CHIUMENTO**

Thèse dirigée par **Victor DUARTE**, Chargé de recherche, CNRS, Institut de Recherche Interdisciplinaire de Grenoble et codirigée par **Mohamed ATTA**, Directeur de Recherche, CEA de Grenoble, Institut de Recherche Interdisciplinaire de Grenoble

préparée au sein du **Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux** dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Les bactériocines RumC, une nouvelle famille de peptides antimicrobiens comme alternative aux antibiotiques conventionnels

Thèse soutenue publiquement le **11 octobre 2019**
devant le jury composé de :

Mme Séverine ZIRAH Maître de conférences, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Mme Marie-Pierre GOLINELLI Chargée de recherche, CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles	Examineur
M. Didier BOTURYN Directeur de recherche, CNRS, Département de Chimie Moléculaire	Président
M. Philippe BULET Directeur de recherche, CNRS, Plateforme BioPark d'Archamps	Examineur
M. Victor DUARTE Chargé de recherche, CNRS, Institut de Recherche Interdisciplinaire de Grenoble	Invité
M. Mickaël LAFOND Maître de conférences, Aix-Marseille Université	Invité
M. Mohamed ATTA Directeur de recherche, CEA Grenoble, Institut de Recherche Interdisciplinaire de Grenoble	Invité



« J'ai appris à être plus patient »

Roger Federer

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement mes directeurs de thèses, Victor Duarte et Mohamed Atta. Cette thèse a été une véritable aventure dans le domaine inconnu des peptides antimicrobiens, et qu'est-ce qu'elle fut enrichissante ! D'une part d'un point de vue scientifique, mais surtout humain. Victor merci d'être toujours à l'écoute, compréhensif et de bons conseils. C'est simple, lorsque l'on me demande quel chef de projet je voudrais être, il me suffit de parler de toi. Hamid, bien que le sujet ce soit rapidement éloigné des radical-SAM, tu as vite pris goût aux peptides antimicrobiens et montré un enthousiasme quotidien sur cette thématique. Nous avons aussi démontré qu'un supporter parisien et un marseillais peuvent survivre 3 ans dans le même bureau. Dès que j'en ai eu besoin, j'ai toujours pu compter sur vous deux, merci pour ces trois ans.

Je tenais à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et d'être venu à la soutenance, cette journée restera inoubliable.

Je remercie Stéphane Ménage, directeur du Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, et Patrice Catty, directeur adjoint, ainsi que tous les membres du laboratoire pour m'avoir accueilli dans une ambiance amicale et pour toutes les discussions quotidiennes.

Je souhaite aussi remercier les personnes qui ont travaillé quotidiennement à mes côtés sur ce projet. Christian Basset, merci de m'avoir initié à la biochimie, merci pour ton aide quotidienne sur toutes les manips et surtout merci pour chanter à longueur de journée des chansons qui restent dans la tête. Ça a été un réel plaisir de passer ces trois années ensemble, et merci pour ton organisation touristique toujours au top ! Chloé Leprêtre, merci de m'avoir suivi dans toutes les manips que je proposais et d'avoir apporté beaucoup d'énergie à cette équipe. J'ai connu quelques moments difficiles durant ma thèse, tu as été là pour me remotiver tout de suite. Je remercie Dwi Adityarini pour son apport au projet et pour la découverte de la culture indonésienne et Louis Dru pour sa bonne humeur quotidienne et tous nos échanges sur notre passion commune, le Japon.

Un grand merci à toute l'équipe Biocat, Sandrine Ollagnier-de Choudens, Christelle Caux-Thang, Vincent Nivière, Philippe Carpentier, Catherine Gerez, Christine Cavazza, Julien Pérard, Elizabeth Darrouzet et John Willison. Ça a été un vrai plaisir de vous côtoyer au quotidien pendant ces trois années.

Si ce projet a aussi bien fonctionné c'est grâce à l'implication de tous les collaborateurs. Pour la spectrométrie de masse, je remercie Yohann Couté et Sylvie Kieffer-Jaquinod. Sylvie, je ne sais pas combien de centaines d'échantillons tu as analysé, mais tu es toujours allée chercher des petits détails dans chaque échantillon pour faire avancer le projet. Le jour où tu as détecté ce fameux -8 Da restera un des meilleurs souvenirs de cette thèse. Tu as toujours été là pour répondre à mes questions, à m'aider pour chaque présentation/congrès, prête à aider si j'avais besoin de quoi que ce soit. Que dire à part que ce fut génial de travailler avec toi.

Remerciements

Les marseillais, Mickaël Lafond, Josette Perrier, Marc Maresca, Thierry Giardina, Michel Fons, Sybille Tachon merci pour votre accueil à chaque fois que je descendais. Je me souviendrais toujours de cette boîte faite avec Sybille qui nous a montré pour la première fois que C1 était actif. Toutes nos discussions m'ont permis de m'initier au monde de la microbiologie, partager ce projet avec vous a été un réel plaisir. Françoise Guerlesquin et Olivier Bornet, merci pour votre patience et votre aide pour produire cet échantillon viable de C1 doublement marqué ! Enfin je tenais à remercier Estelle Devillard pour son soutien à ce projet. Je souhaite finalement remercier Clarisse Roblin. Je pense que ça a été une réelle chance que l'on partage notre thèse et je pense que l'on se souviendra tous les deux l'AMP 2018, congrès qui marque un tournant dans le projet. Je te souhaite plein de succès pour la suite de ta carrière.

Je souhaite maintenant remercier les non permanents du laboratoire. Merci pour tous les moments partagés au et à l'extérieur du laboratoire qui m'ont permis de vite m'habituer à la vie grenobloise ! Merci à Serge Nader, Marianne Marchioni, Jérémy Caburet, Martin Pelosse, Jordan Mangue, Hind Basbous, Nathan Coutard, Marc-André Hograindleur, Julien Massin, Sarah Lopez, Jaione Saez Cabodevilla, Alexandre Requet, Umberto Contaldo, Tim Rosser, Nick Randell. J'ai une pensée particulière pour Johanna Cormenier, Marila Alfano, Lucile Chiari, Jordan Donat et Guillaume Frémy avec qui cette thèse a commencé. Je vous souhaite à tous plein de succès pour vos prochaines aventures !

Je remercie aussi tous mes amis, les parisiens, Martin, Aodren, Jean-Marc, Hendrik, Florian, Nicolas, Canelle, Yves, Valentin, Simon, Baptiste, Alexandre, Sébastien qui m'ont toujours soutenu, bien que je n'ai pu être très présent ces dernières années. Les montpelliérains, Mikail pour m'avoir poussé pendant deux ans à faire une thèse, Mathieu pour toutes les soirées Koh-lanta et nos discussions autour du sport, Paul, Caroline, Gildas, Aline, Rodolphe, Chloé, Robin. Johan merci de m'avoir initié à l'escape game il y a trois ans, maintenant j'embête Pauline pour en faire tout le temps ! Et tous ceux que j'ai rencontrés au cours de ces trois dernières années, en particulier Camille et François.

Pour compléter ces remerciements, je vais remercier ma famille. Mes parents, merci pour votre soutien ces dix dernières années, j'ai toujours eu la chance de pouvoir faire les études que je voulais où je voulais, en profiter un maximum et c'est grâce à vous. Tiffany, merci d'être une source de motivation, quand le matin je me réveille avec un coup de moins bien, j'ai juste besoin de penser à tout ce que tu es capable de faire et ça redémarre. Maxime, je vais faire simple, tu dis souvent que tu es fier de m'avoir comme petit frère. Je peux enfin te renvoyer le message et te dire à quel point je suis fier que tu sois mon frère. Je n'oublie pas mes grands-parents, Louis, Georgette, Jeannette pour toutes les valeurs qu'ils m'ont transmise et mon neveu Noah à qui j'ai donné une vocation de chimiste apparemment. Je tiens aussi à remercier ma belle-famille, Nicole, Pascal, Cyril et Quentin, merci de m'avoir accueilli de nombreux week-ends, ils ont été essentiels au cours de la rédaction notamment !

Enfin, merci Pauline, depuis deux ans tu m'apportes un soutien sans faille et tu t'es toujours débrouillée pour que je sois dans les meilleures conditions pour cette thèse, en particulier ces six derniers mois, où j'ai été focalisé dessus. Merci de m'avoir changé les idées chaque week-end, chaque soir, et d'avoir rendu cette étape de ma vie simple.

Liste des acronymes	5
Nomenclature des bactériocines RumC	6
Introduction générale.....	7
Chapitre 1 : La résistance aux antimicrobiens	9
1.1 Les mécanismes de l'antibiorésistance.....	10
1.1.1 Diminution de la perméabilité.....	11
1.1.2 Les pompes d'efflux	11
1.1.3 Mutations conférant les résistances	11
1.1.4 Inactivation de l'antibiotique.....	12
1.1.5 Les biofilms	12
1.1.6 Combinaison des mécanismes de résistance	13
1.2 Rôles naturels des antibiotiques	13
1.3 Rôles naturels des mécanismes de résistance	14
1.4 La propagation des gènes de résistance	17
1.5 Impact de l'homme sur la résistance aux antibiotiques	19
1.5.1 Une augmentation dramatique de ce phénomène	19
1.5.2 Les prédictions	20
1.6 Les centres de contrôle et systèmes de surveillance.....	22
1.7 Souches prioritaires résistantes aux antibiotiques.....	23
1.8 L'approche One Health	25
1.9 Traitements contre les bactéries multirésistantes	26
1.9.1 Maintenir la vie thérapeutique des antibiotiques actuels	26
1.9.2 Développer de nouveaux traitements	27
Chapitre 2 : Le développement de nouveaux traitements	29
2.1 Les vaccins	30
2.1.1 Le potentiel des vaccins	30
2.1.2 Les vaccins en développement	32
2.1.3 Les barrières à l'utilisation.....	32
2.2 La phagothérapie	33
2.2.1 Le cycle de vie d'un phage.....	34
2.2.2 Les avantages de la phagothérapie.....	35
2.2.3 Les défis actuels	36
2.2.4 Une utilisation combinée ?.....	36
2.2.5 Le développement clinique	37
2.3 Les peptides antimicrobiens.....	37

2.3.1 Les RiPPs.....	38
2.3.2 La nisine, modèle des lanthipeptides.....	40
2.3.3 Les peptides lasso	41
2.3.4 Les thiopeptides.....	43
2.3.5 Le potentiel des peptides antimicrobiens	45
2.3.6 Les défis d'un développement clinique.....	46
2.3.7 Les sources de peptides antimicrobiens	47
Chapitre 3 : Les bactériocines de <i>Ruminococcus gnavus</i> E1	49
3.1 Les peptides antimicrobiens dans l'homéostasie	50
3.2 <i>Ruminococcus gnavus</i> E1	51
3.3 La Ruminococcin A.....	53
3.4 Les Ruminococcins C.....	54
3.5 Les sactipeptides.....	57
3.5.1 Les ranthipeptides.....	58
3.6 Les enzymes radical-SAM.....	59
3.7 Les radical-SAM et la biosynthèse de RiPPs	60
3.7.1 Les C-méthylations.....	60
3.7.2 Les ponts C-C.....	62
3.7.3 Les épimérisations	62
3.7.4 Les décarboxylations suivies d'une liaison C-C.....	63
3.7.5 Réarrangements.....	64
3.8 Contexte et objectifs de la thèse	65
Chapitre 4 : Caractérisation de l'enzyme radical-SAM RumMc1	67
4.1 Les enzymes radical-SAM à domaine SPASM et Twitch.....	68
4.2 Fonction des centres additionnels.....	71
4.2.1 Relai d'électron	71
4.2.2 Coordination du substrat.....	72
4.2.3 Donneur de soufre	72
4.2.4 Activateur de co-substrat	72
4.3 RumMc1 et RumMc2	73
4.4 Production et purification de l'enzyme RumMc1	75
4.4.1 Protocole aérobie, purification de la forme apo de l'enzyme RumMc1	75
4.4.2 Protocole aérobie, reconstitution des centres fer-soufre.....	77
4.4.3 Protocole anaérobie, purification de la forme holo de l'enzyme RumMc1 ..	77
4.4.4 Dosage du fer de holo-RumMc1	79

4.5 Caractérisation biophysique de RumMc1	79
4.5.1 Caractérisation de l'état oxydé de RumMc1 par spectroscopie Mössbauer.	79
4.5.2 Caractérisation de l'état réduit de RumMc1 par spectroscopie RPE	82
4.6 Discussion sur le mécanisme de maturation des sactipeptides	86
4.6.1 Le rôle des centres additionnels	86
4.6.2 Reconnaissance de RiPPs.....	91
4.6.3 Perspectives de l'étude de RumMc1.....	92
Chapitre 5 : Production hétérologue de la bactériocine RumC1	93
5.1 Expression hétérologue de nRumC1.....	94
5.1.1 Production et purification de nRumC1.....	95
5.2 Maturation hétérologue de nRumC1 par RumMc1	97
5.2.1 Production et purification de mRumC1.....	98
5.3 Caractérisation biochimique et structurale de mRumC1.....	100
5.3.1 Dichroïsme circulaire en UV lointain.....	100
5.3.2 Analyse du peptide mRumC1 par spectrométrie de masse	101
5.3.3 Alkylation des cystéines de mRumC1.....	102
5.3.4 Spectrométrie de masse en tandem MS/MS.....	103
5.3.5 Mutagenèse dirigée sur mRumC1.....	104
5.3.6 Etude RMN de RumC1	108
5.3.7 RumC1 produit par <i>R. gnavus</i> E1	111
5.4 Rôle du peptide leader dans la maturation de RumC1	112
5.4.1 Rôle du peptide leader dans la maturation de RiPPs.....	116
5.4.2 Mutagenèse dirigée de la séquence leader de RiPPs.....	118
Chapitre 6 : Activité antibactérienne de RumC1.....	121
6.1 Rôle du peptide leader dans l'activité antimicrobienne de RumC1	122
6.2 Activité biologique de RumC1	126
6.3 Activité biologique des sactipeptides	128
6.4 Etude du mode d'action de RumC1	132
6.4.1 Exemples de modes d'action pour les sactipeptides	136
6.5 Conclusions sur l'étude de l'activité biologique de RumC1	137
Conclusion générale et perspectives.....	139
Chapitre 7 : Matériels et méthodes	145
7.1 Matériel biologique.....	145
7.1.1 Les souches bactériennes.....	145
7.1.2 Les plasmides.....	145

7.1.3 Les milieux de culture.....	146
7.2 Méthodes de biologie moléculaire	147
7.2.1 Préparation de bactéries compétentes	147
7.2.2 Transformation des cellules compétentes	147
7.2.3 Insertion d'une ou plusieurs mutations par mutagenèse dirigée.....	148
7.2.4 Extraction et préparation des plasmides.....	150
7.3 Méthodes de biochimie	150
7.3.1 Surexpression des protéines.....	150
7.3.2 Purification des protéines	152
7.3.3 Données des protéines.....	154
7.3.4 Production et purification de la SAM	154
7.3.5 Reconstitution des centres [4Fe-4S] en anaérobie	154
7.3.6 Dosage du fer	155
7.3.7 Test d'alkylation des cystéines	155
7.3.8 Tests d'activités de l'enzyme RumMc1	155
7.3.9 Clivage du peptide leader.....	156
7.4 Méthode d'analyse de l'activité antibactérienne	156
7.4.1 Tests d'activités.....	156
7.4.2 Déterminations des concentrations minimales inhibitrices	156
7.5 Méthodes d'analyses	157
7.5.1 Spectroscopie Mössbauer	157
7.5.2 La Résonance Paramagnétique Electronique	158
7.5.3 Spectroscopie UV-visible	159
7.5.4 Chromatographie liquide en phase inverse.....	160
7.5.5 Spectrométrie de masse.....	160
7.5.6 Résonance Magnétique Nucléaire	161
7.5.7 Dichroïsme circulaire.....	163
Bibliographie	165
Publication	181

Liste des acronymes

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
AMR	AntiMicrobial Resistance
ansMe	anaerobic Sulfatase Maturase enzyme
BHI-YH	Brain Heart Infusion – Yeast extract and Hemin
CD	Dichroïsme Circulaire
CDC	Center for Diseases Control and Prevention
CEASAR	Réseau de surveillance de la résistance aux antimicrobiens en Asie centrale et en Europe orientale
CsdA	Cysteine desulfurase
CTAB	Bromure de cétrimonium
EARS-Net	Réseau de surveillance européen de la résistance aux antimicrobiens
Dha	Dehydroalanine
Dhb	Dehydrobutyrine
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
DTT	Dithiothréitol
Edyp	Exploring of the Dynamics of Proteomes
FDA	Food and Drug Administration
Fgly	Formylglycine
GARDP	Partenariat mondial pour la recherche et le développement d'antibiotiques
GLASS	Système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens
GTP	Guanosine Triphosphate
Hib	Haemophilus influenza type b
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HTG	Horizontal Gene Transfer
IACG	Groupe de coordination inter-institutions sur la résistance aux antimicrobiens
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Isc	Iron-sulfur cluster
IMM	Institut de Microbiologie de la Méditerranée
IP	Iodure de Propidium
IRIG	Institut de Recherche Interdisciplinaire de Grenoble
ISM2	Institut des Sciences Moléculaires de Marseille
KLD	Kinase-Ligase-Dpnl
Lan	Lanthionine
LB	Lysogeny Broth
LCBM	Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux

Liste des acronymes

MBC	Concentration Minimale Bactéricide
MBP	Maltose Binding Protein
MCS	Site de clonage Multiple
MDR	Multi Drug Resistant
Melan	Methyl-lanthionine
MIC	Concentration Minimale Inhibitrice
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
Moco	Cofacteur molybdène
MRSA	Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
MuFoPAM	MultiFonction des Peptides AntiMicrobiens
Ni-NTA	Nickel-nitrolotriactic acid
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
NR	Nisin resistant
NRP	NonRibosomal peptide
NCE	Normalized Collision Energies
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAM	Peptide AntiMicrobien
PCR	Polymerase Chain Reaction
Qnr	quinolone resistance protein
RiPP	Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptide
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
SAM	S-adenosylmethionine
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Skf	Sporulation killing factor
SPASM	Subtilisin A, Pyrroloquinoline quinon, Anaerobic Sulfatase, Mycofactin
TEV	Tobacco etch virus
TIM	Triose-phosphate isomerase
TOCSY	Total correlation spectroscopy
UV-vis	UV-visible
VER	Vancomycin-Resistant Enterococci
wHTH	wing Helix-Turn-Helix

Nomenclature des bactériocines RumC

RumC1	Séquence de 44 acides aminés modifiée
nRumC1	Séquence de 67 acides aminés non modifiée
mRumC1	Séquence de 67 acides aminés modifiée
wplRumC1	Séquence de 44 acides aminés non modifiée
PL19	Séquence leader de 19 acides aminés

Introduction générale

Au début du 20^{ème} siècle, la découverte accidentelle de la pénicilline par Alexander Fleming a révolutionné la médecine en initiant le développement d'antibiotiques, médicaments utilisés couramment en santé humaine et animale. Cependant lorsqu'Alexander Fleming reçut son prix Nobel en 1945, il a tout de suite mis en garde qu'une mauvaise utilisation de la pénicilline engendrerait l'apparition de bactéries résistantes à cette dernière. Aujourd'hui la résistance aux antibiotiques, et plus globalement la résistance aux antimicrobiens, est devenue un problème majeur de santé publique. La résistance aux antimicrobiens, responsable de 750 000 morts par an, est l'une des priorités de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). En complément d'une prise de conscience globale de la population, il est nécessaire de développer de nouvelles molécules ou voies thérapeutiques pour lutter contre l'émergence de souches résistantes. Dans ce sens, les peptides antimicrobiens semblent être de bons candidats. Ces macromolécules sont produites naturellement et participent à la défense de l'organisme producteur, eucaryote ou procaryote. Ces peptides présentent une grande diversité structurale et fonctionnelle, et possèdent un spectre d'activité large, incluant des bactéries à Gram positif et négatif, des virus, des champignons et des protozoaires unicellulaires.

Les travaux de cette thèse se focalisent sur l'étude des bactériocines RumC, des peptides produits par *Ruminococcus gnavus* E1, souche commensale du microbiote intestinal humain. Les trois premiers chapitres de ce manuscrit sont consacrés à une introduction bibliographique. Le premier présente la résistance aux antibiotiques, phénomène naturel de défense des bactéries qui a augmenté de façon exponentielle au cours du dernier siècle. Le second chapitre décrit de nouveaux moyens de lutter contre les bactéries résistantes, et se focalise en particulier sur le potentiel des peptides antimicrobiens, alternatives possibles aux molécules conventionnelles. Le troisième chapitre se concentre sur les bactériocines RumC produites par *R. gnavus* E1 et présente un groupe particulier de peptides, les sactipeptides. Ces derniers contiennent des ponts thioéther particuliers introduits par une enzyme radical-SAM. Les chapitres suivants sont consacrés à la présentation et à la discussion des résultats obtenus, en commençant dans le quatrième chapitre par la caractérisation de l'enzyme RumMc1 impliquée dans la biosynthèse des bactériocines RumC. La production et la maturation hétérologues de la bactériocine RumC1 sont présentées dans le chapitre cinq. La caractérisation complète de ce peptide par spectrométrie de masse, qui nous a permis de proposer une structure originale pour ce peptide modifié, est également détaillée dans ce chapitre. Enfin, l'activité antimicrobienne du peptide RumC1 est discutée au cours du chapitre six, avec en particulier l'étude de son spectre d'activité antibactérienne et les résultats préliminaires sur son mode d'action.

Chapitre 1 : La résistance aux antimicrobiens

Les agents antimicrobiens sont des médicaments efficaces contre des infections causées par des bactéries, virus, champignons et parasites. La résistance aux antimicrobiens (AMR pour *AntiMicrobial Resistance*) apparaît quand les micro-organismes (e.g. les bactéries) survivent aux médicaments qui les tuent ou stoppent leur croissance. Ces souches exposées vont par la suite se répandre, et croître dû au manque de compétition d'autres souches, aboutissant ainsi à l'émergence de « superbactéries », résistantes à une ou plusieurs classes d'antibiotiques. L'émergence de bactéries multirésistantes et le faible développement de nouveaux composés pharmaceutiques font que des infections redeviennent mortelles. Comme le rapporte l'OMS au cours de son rapport annuel sur la surveillance des résistances aux antimicrobiens en Asie centrale et Europe de l'est, le monde se dirige vers une ère post-antibiotiques où des infections communes tueront de nouveau (The Regional Office for Europe of the World Health Organization, 2016). Il est important de rappeler que le phénomène de résistance aux antimicrobiens est un processus naturel. Il a été proposé que les β -lactamases, enzyme responsable de la dégradation des β -lactamines, étaient initialement des protéines impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane, et que leur rôle dans la résistance n'est qu'un rôle secondaire à leur fonction originale (Martinez Jose L., 2009). Par phylogénie, des gènes conférant une résistance ont été identifiés, datant de plusieurs milliers d'années, chez des bactéries durant l'ère pré-antibiotiques (D'Costa et al., 2011). Cependant bien que ce phénomène de résistance soit naturel, il a été accentué ces dernières années par un mauvais emploi et une surutilisation des antibiotiques, augmentant ainsi le développement et la propagation des résistances à travers le monde. Nous devons faire face aujourd'hui à une menace grandissante avec un arsenal pharmaceutique réduit.

Au cours de notre histoire moderne, les infections dues à des bactéries résistantes étaient associées au milieu hospitalier, mais durant la dernière décennie elles sont devenues de plus en plus communes. Ce phénomène touche tous les pays, en accord avec leur niveau de consommation d'antibiotiques. Cependant, ces dernières années il y a une réelle prise de conscience de cette crise annoncée des antibiotiques. En effet, l'OMS a publié en 2014 son premier rapport sur la résistance aux antimicrobiens montrant que cette menace était bien réelle (2014). Cette tendance a été confirmée par la présentation du rapport de Lord J. O'Neill de l'impact de la résistance aux antibiotiques sur notre société d'ici 2050 (O'Neill, 2016).

Afin de mieux comprendre l'émergence des souches résistantes et multirésistantes, les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques seront présentés pour ensuite discuter des facteurs qui influencent la propagation des résistances aux antimicrobiens.

1.1 Les mécanismes de l'antibiorésistance

Dans le but de survivre, les bactéries ont développé différents mécanismes de résistance. Elles acquièrent ces résistances par mutation spontanée ou à partir de gènes de résistance d'autres bactéries, incluant les bactéries qui sont elles-mêmes productrices d'agents antibactériens. Ces gènes vont être intégrés au génome par recombinaison génétique, majoritairement par des intégrons (séquences ADN structurées en cassettes pouvant être intégrées au génome) et disséminés à travers la population microbienne par transfert génétique (Davies, 1994). Cette immense plasticité génétique permet aux bactéries de développer une certaine capacité d'adaptation et de répondre à l'attaque des antibiotiques. La compréhension des mécanismes de résistance, que ce soit d'un point de vue biochimique ou génétique, est importante dans l'espoir de réduire l'émergence des souches résistantes. Les principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques, illustrés en Figure 1, seront détaillés (Munita and Arias, 2016).

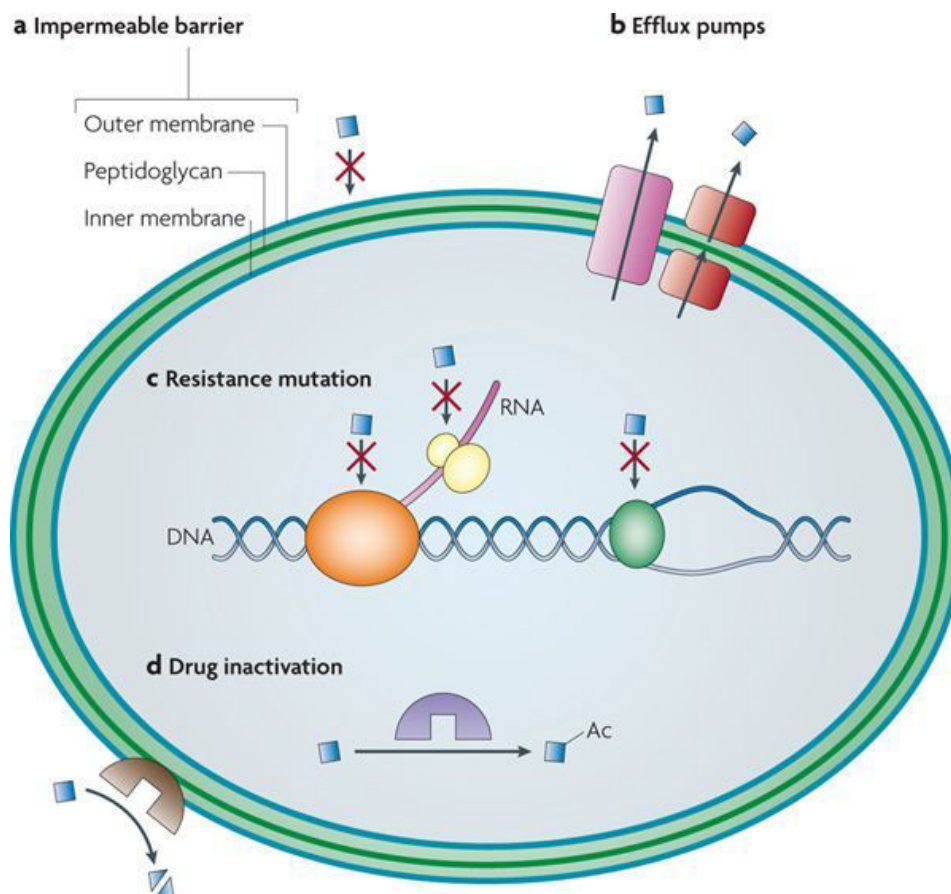


Figure 1.1 : Mécanismes de la résistance aux antibiotiques chez une bactérie à Gram négatif. **a** Diminution de la perméabilité. **b** Pompes d'efflux. **c** Mutations conférant les résistances. **d** Inactivation de l'antibiotique (Allen et al., 2010).

1.1.1 Diminution de la perméabilité

De nombreux antibiotiques utilisés cliniquement ont une cible intracellulaire, où dans le cas des bactéries à Gram négatif, dans la membrane interne. Les bactéries ont développé des mécanismes permettant de limiter l'influx de molécules extérieures (Figure 1.1). En effet, les molécules hydrophiles comme les β -lactamines, les tétracyclines ou encore les fluoroquinolones ont tendance à diffuser à travers la membrane par des porines (canaux permettant la diffusion de petites molécules hydrophiles) de la membrane extérieure (Munita and Arias, 2016).

La résistance aux antibiotiques résultant de l'altération des porines peut être due à un changement du niveau d'expression, d'une modification du type de porine mais aussi à une perturbation de la fonction. Un des exemples de modification de porine impliquée dans l'antibiorésistance est un cas clinique de *Klebsiella pneumoniae* étudiée avant et après traitement aux antibiotiques. La souche isolée post-thérapie montre un changement d'expression de la porine OmpK35 à OmpK36 (présentant une taille de canal plus faible), diminuant l'incorporation de β -lactamines (Doménech-Sánchez et al., 2003).

1.1.2 Les pompes d'efflux

La production de machineries complexes bactériennes permettant l'export d'un composé toxique, en général, est un mécanisme de résistance aux antibiotiques (Figure 1.1). Ce mécanisme existe chez des bactéries à Gram positif et négatif. Il faut noter que ces pompes (aussi appelées pompes d'efflux MDR pour *Multi Drug Resistant*) peuvent être spécifiques d'un substrat ou avoir un spectre large de substrat. On retrouve ce dernier cas chez les bactéries multirésistantes (bactérie MDR). Ce mécanisme de résistance affecte un grand nombre de molécules aux propriétés antibactériennes : les fluoroquinolones, les β -lactamines, les carbapénèmes, les polymyxines et les inhibiteurs de synthèse protéiques. L'exemple classique de la résistance médiée par les pompes d'efflux est la résistance aux tétracyclines. Les pompes d'efflux Tet rejettent les tétracyclines via un transporteur actif de type pompe à protons (Munita and Arias, 2016).

1.1.3 Mutations conférant les résistances

Un moyen commun pour développer une résistance à un antibiotique est de l'empêcher de rentrer en contact avec sa cible (Figure 1.1). Pour ce faire deux grandes stratégies ont été développées par les micro-organismes. La première étant de protéger la cible moléculaire (empêchant ainsi l'antibiotique d'atteindre son site d'action) ou de la modifier pour diminuer l'affinité de l'antibiotique pour celle-ci (Munita and Arias, 2016).

L'exemple classique de protection de la cible, concerne les déterminants de la résistance à la tétracycline Tet(M) et Tet(O) répandus dans de nombreuses espèces de bactéries. Les tétracyclines sont des antibiotiques interagissant avec les

ribosomes pour empêcher la fixation d'aminocyl-ARNt, bloquant ainsi la traduction. Les protéines Tet(M) et Tet(O) (facteurs de traductions appartenant à la famille des GTPases), interagissent avec le ribosome et délogent la tétracycline de façon GTP-dépendante. De plus cette interaction modifie la structure du ribosome, empêchant une nouvelle interaction de la tétracycline (Munita and Arias, 2016).

La modification moléculaire de la cible est l'un des mécanismes de résistance les plus communs et affectant pratiquement toutes les classes d'antibiotiques. Les changements moléculaires peuvent consister en une mutation ponctuelle du site ciblé, une altération enzymatique du site de liaison ou encore le remplacement de la cible originale. Comme exemple de mutation ponctuelle, on peut citer le cas de la résistance à la rifampicine, inhibiteur de la transcription. Des mutations de l'ARN polymérase vont diminuer son affinité pour la rifampicine, sans altération de son activité. Un exemple de résistance aux macrolides implique une modification enzymatique de la cible, une méthylation du ribosome empêche la fixation de l'antibiotique. Enfin dans le cas d'un remplacement de la cible originale, on peut citer la résistance à la vancomycine chez les entérocoques, où a lieu une modification structurale du peptidoglycane, cible de l'antibiotique (Munita and Arias, 2016).

1.1.4 Inactivation de l'antibiotique

Un autre mécanisme de résistance aux antibiotiques est la modification ou la dégradation de l'antibiotique lui-même (Figure 1.1). D'une part il peut être modifié chimiquement et perdre son activité, comme dans certains cas de résistance au chloramphénicol, où ce dernier est acétylé par des enzymes de modifications, lui enlevant son activité inhibitrice de la traduction. D'autre part l'antibiotique peut-être totalement dégradé, on peut citer l'action des β -lactamases sur les antibiotiques à noyau β -lactame (pénicilline et ses dérivés) (Kapoor et al., 2017).

1.1.5 Les biofilms

Le *quorum sensing*, ensemble de mécanismes de régulation permettant la synchronisation de l'expression de gènes au sein d'une ou plusieurs populations bactériennes, peut induire naturellement la formation de biofilms. Les micro-organismes secrètent un composé adhésif, essentiellement constitué de polysaccharides, leur permettant d'adhérer entre eux et ainsi augmenter la densité de population (Figure 1.2). Le résultat est qu'avec la formation de cette matrice, l'antibiotique perdra sa capacité à diffuser à travers les bactéries pour atteindre sa cible. D'autres hypothèses proposent que la formation du biofilm entraîne la mise en place d'un microenvironnement au sein du biofilm altérant la molécule antibiotique et minimisant son effet. La dernière hypothèse est que les bactéries vont rester dans un état phénotypique unique très protégé, proche de l'état de sporulation (Stewart and William Costerton, 2001).

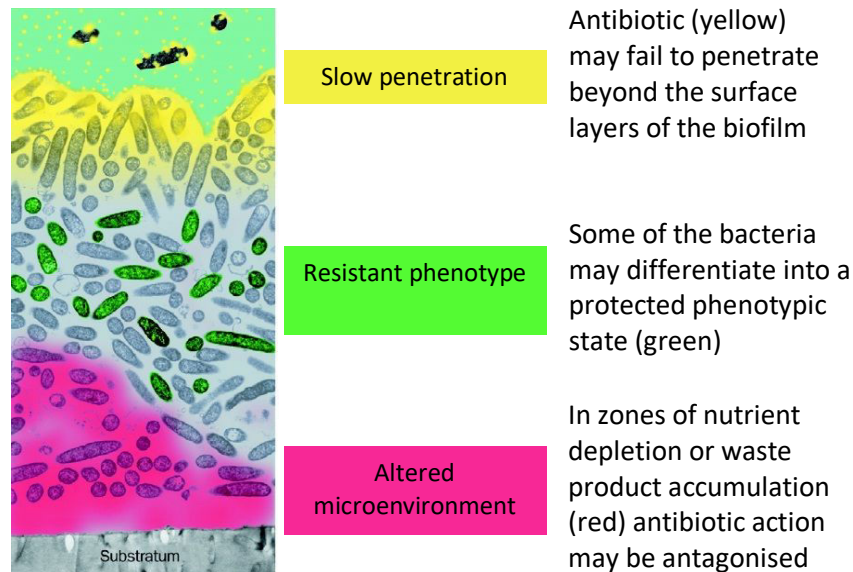


Figure 1.2 : Hypothèses sur la résistance aux antibiotiques dans un biofilm (adaptée de Stewart and William Costerton, 2001).

1.1.6 Combinaison des mécanismes de résistance

Dans de nombreux cas de résistance à un antibiotique, l'apparition de la résistance est due à une combinaison des mécanismes présentés précédemment. Par exemple une étude sur des souches résistantes de *Pseudomonas aeruginosa*, a montré que les bactéries en biofilm avaient tendance à surexprimer des pompes d'efflux, par rapport aux cellules bactériennes planctoniques, et sont donc plus résistantes aux traitements médicaux (Ali et al., 2018). Un autre exemple bien connu est la résistance aux fluoroquinolones pouvant combiner : une modification du site de liaison des fluoroquinolones (sur les gyrases et topoisomérases IV), une surexpression des pompes d'efflux pour exporter l'antibiotique et enfin une protection de la cible des fluoroquinolones par une protéine spécifique (Qnr pour *quinolone resistance protein*) (Munita and Arias, 2016).

1.2 Rôles naturels des antibiotiques

Afin de survivre au sein d'un écosystème riche, les populations bactériennes et les cellules eucaryotes, produisent de petites molécules bioactives, constituant un véritable armement afin de survivre au sein d'un biotope. Ces molécules ont pendant longtemps été ignorées, excepté certains composés, utilisés pour des activités thérapeutiques, qui ont changé l'histoire de la médecine moderne (par exemple la pénicilline) (Davies, 2013). Chez les bactéries, elles ont un rôle naturel essentiel en participant à la physiologie cellulaire tout en jouant un rôle primordial dans les interactions intra et extracellulaires. Habituellement utilisées pour le *quorum sensing* et jouant sur divers aspects du cycle de vie bactérien comme la formation de biofilm ou la composition de la communauté microbienne, ces

molécules vont à faible concentration, activer des voies biochimiques chez un ou plusieurs organismes cibles (Allen et al., 2010). Il est intéressant de noter qu'à plus grande concentration ces molécules vont pouvoir provoquer un changement chez l'organisme hôte eucaryote, comme par exemple le farnesol produit par la levure *Candida albicans* qui altère la fluidité membranaire des cellules de l'hôte (Navarathna et al., 2007). Les petites molécules bioactives jouent donc un rôle important dans la biologie microbienne. Des exemples ont montré que ces petites molécules ont un rôle antibactérien au sein de leur écosystème. A titre d'exemple, on peut citer le contrôle de l'agent causant la gale de la pomme de terre, *Streptomyces scabies* str. RB4, par *Streptomyces diastatocromogenes* str. PonSSII, produisant un agent antibactérien. L'isolation de la souche pathogène résistante a permis de mener des expériences de co-inoculation, par ces deux souches, aboutissant à la restauration de la maladie confirmant l'activité de la molécule produite par *S. diastatocromogenes* str. PonSSII (Neeno-Eckwall et al., 2001) (Allen et al., 2010). Nous décrirons de manière plus détaillée dans la suite de ce mémoire les études de macromolécules à propriétés antibactériennes, les peptides antimicrobiens.

1.3 Rôles naturels des mécanismes de résistance

Contrairement à l'idée commune que la mobilisation des gènes nécessaires à la résistance est due uniquement à notre utilisation moderne des antibiotiques (Allen et al., 2010), l'étude phylogénétique de gènes encodant des β -lactamases a permis de remonter à plus de cinq cent millions d'années (Barlow and Hall, 2002). Il a été montré, au cours de l'évolution, que ces gènes sont souvent associés aux éléments génétiques mobiles et peuvent être transférés d'une espèce à une autre (Davies, 1994). Le mécanisme le plus commun est le transfert horizontal de gènes (HGT pour *Horizontal Gene Transfer*), illustré en Figure 1.3. Très fréquemment, la conjugaison permet un transfert direct de matériel génétique entre deux bactéries. La transduction, transfert génétique via l'intermédiaire d'un phage, et la transformation, absorption de molécules d'ADN de l'environnement extérieur, sont moins fréquents (Furuya and Lowy, 2006). Le transfert de plasmide intra ou inter espèces peut aussi être assuré par la présence de nanotubes entre les bactéries (Dubey and Ben-Yehuda, 2011). Ces transferts de gènes peuvent être, par exemple, induits par la présence de bactéries productrices de molécules antibactériennes, transférant leur propres gènes de résistance. Le transfert de gènes horizontal a donc

joué un rôle clé au cours de l'évolution pour la survie de certaines souches bactériennes au sein de leur environnement.

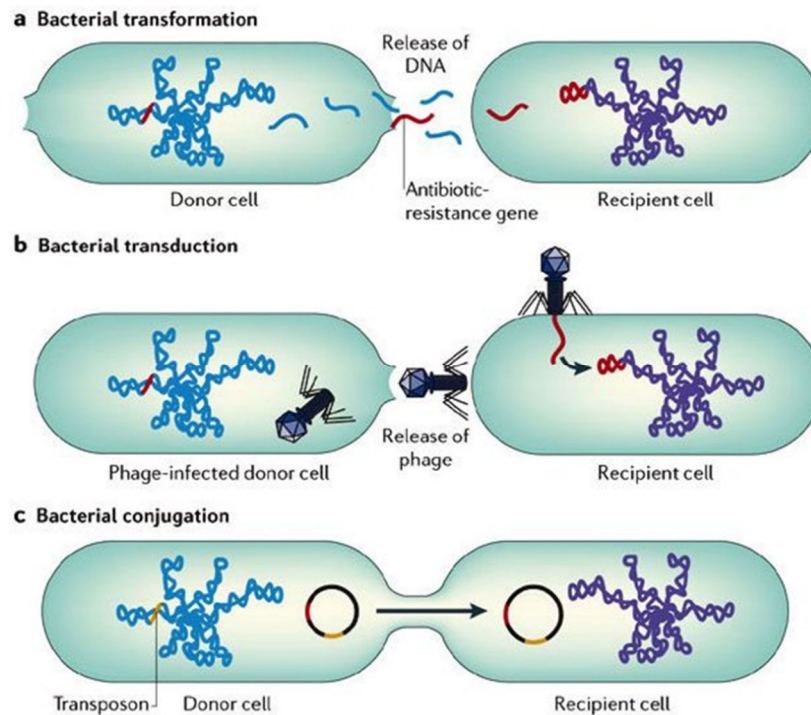


Figure 1.3 : Transfert horizontal de gènes entre micro-organismes (Furuya and Lowy, 2006).

La production d'un antibiotique par un organisme est toujours associée à la présence de gènes codant une, ou plusieurs, protéines impliquées dans l'autodéfense. En plus d'une fonction de protection, ces gènes présents dans l'opéron responsable de la biosynthèse de la molécule active, pourraient être impliqués dans la régulation de la voie de biosynthèse. L'apparition de gènes de résistance peut aussi être due à des mutations spontanées en réponse à l'environnement. Cette flexibilité génétique entraîne ainsi une grande diversité phénotypique métabolique, leurs permettant de se développer dans cet écosystème par leur habilité à utiliser les différentes sources de carbones, d'azotes ou phosphates. La présence de molécules actives et, ou, un environnement pauvre exerce une pression sélective favorisant le développement des résistances nécessaires au bon développement des bactéries (Allen et al., 2010).

L'environnement joue un rôle essentiel dans l'apparition des résistances. Des études ont montré que des cultures de bactéries provenant de l'interface air/eau étaient plus résistantes que des bactéries provenant uniquement de l'eau. Cette différence a pu être observée dans de nombreuses conditions, comme des milieux irradiés ou pollués (Allen et al., 2010). Les mécanismes de résistance développés permettent aux bactéries de réagir aux antibiotiques (cliniques ou naturels) ainsi qu'à des composés toxiques abiotiques comme les métaux lourds. Si l'on s'intéresse à ces derniers, on retrouve dans la littérature de nombreux exemples où les bactéries

présentes dans la rhizosphère d'une plante vont lui permettre de se développer dans des sols pollués et contaminés (Zhuang et al., 2007).

Dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques, nous avons vu le rôle important des pompes d'efflux MDR, cependant il est important de noter qu'elles sont conservées à travers les trois domaines de la vie, et pas uniquement chez des organismes producteurs de molécules antibactériennes, ce qui suggère que la résistance aux antibiotiques n'est pas leur rôle majeur. Il a été montré que l'expression des différents types de pompes est liée à l'écosystème de la bactérie et participent à la détoxification des métabolites intracellulaires, à la virulence bactérienne, à l'homéostasie ou au trafic intracellulaire. Les pompes d'efflux peuvent évacuer toutes sortes de toxines, elles représentent donc la pièce angulaire d'un mécanisme de défense global (Martinez et al., 2009). Les différentes fonctions des pompes d'efflux sont résumées sur la figure 1.4.

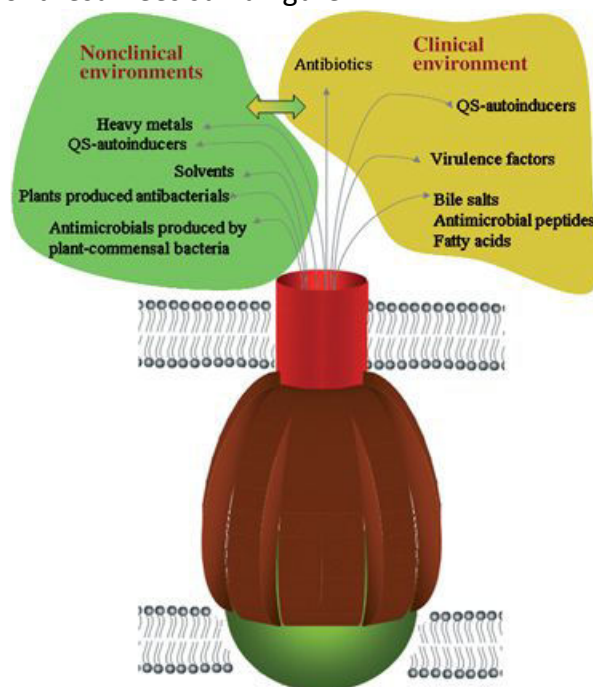


Figure 1.4 : Rôle des pompes d'efflux dans un environnement clinique et non clinique (Martinez et al., 2009). QS : *Quorum Sensing*

Pour une bactérie, pathogène ou non, les pompes MDR sont impliquées dans l'étape de colonisation. Par exemple il a été mis en évidence une surexpression des pompes chez *Pseudomonas putida* durant la colonisation des racines d'une plante. Pour ce qui est des pathogènes, la colonisation peut être arrêtée par la production de composés chimiques de l'hôte, comme des longues chaînes d'acides gras ou des peptides antimicrobiens. Pour résister à ces composés, *Erwinia chrysanthemi* exprime la pompe d'efflux TolC permettant l'extrusion d'un composé antimicrobien, la berberine. Un mutant *tolC* réduit drastiquement la colonisation et donc l'infection de la plante par le pathogène. Chez certaines espèces pathogènes les pompes d'efflux MDR sont essentielles à leur virulence (Martinez et al., 2009).

Par le *quorum sensing*, les bactéries sont capables de répondre à une baisse de densité de la population par la sécrétion d'autoinducteurs. Ces molécules vont permettre de moduler l'expression de gènes jouant sur des fonctions telles que la synthèse de peptides antimicrobiens, de polysaccharides ou encore sur le nombre de facteurs de virulence. Un point clé est comment ces inducteurs vont-ils passer dans le milieu extracellulaire ? Selon la structure et la taille de chacun, les pompes d'efflux MDR peuvent jouer un rôle très important. Par exemple, chez *P. aeruginosa*, dont la détection du quorum a été très étudiée, il a été mis en évidence que des pompes d'efflux sont utilisées dans le transport de N-3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone (3OC12-HSL), et de 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS), dont la nature hydrophobique empêche toute diffusion passive. Dans le cas du 3OC12-HSL, exporté par la pompe d'efflux MDR MexAB-OprM, un mutant de ce transporteur résulte sur une non sécrétion de 3OC12-HSL aboutissant à une baisse de production des facteurs de virulence (Martinez et al., 2009).

Enfin le dernier point soulevé ici sur l'importance de l'antibiorésistance dans la nature concerne les bactéries vivant dans un environnement extrême. Prenons l'exemple de *Cupriavidus metallidurans*, bactéries se retrouvant dans des environnements très riches en métaux lourds (possiblement des environnements volcaniques). L'étude de son génome a montré la présence d'un grand nombre de gènes codant pour des pompes d'efflux, montrant une spécialisation de l'organisme pour vivre et résister à un environnement riche en métaux. Pour le métabolisme bactérien, des traces de métaux lourds sont utilisés en tant que cofacteur, cependant la concentration doit être finement régulée pour le maintien de l'homéostasie des métaux. Les pompes d'efflux MDR seront donc essentielles pour le maintien de la concentration des métaux intracellulaires (Martinez et al., 2009). Certaines bactéries se développent sur des antibiotiques et les utilisent comme sources de carbone et d'azote. Par exemple *Pseudomonas fluorescens* est capable de se développer sur la streptomycine ou la pénicilline et *Flavobacterium* sp. sur le chloramphénicol. Sans l'existence de gènes de résistance, ces souches seraient incapables de survivre. De plus, l'étude des bactéries a permis de mettre en évidence des phénotypes de résistance uniques, comme par exemple l'inactivation de la telithromycine par une modification structurale. La compréhension de ses phénotypes permet de mieux comprendre le développement de résistances et d'améliorer notre prédiction sur l'apparition de ses dernières (Allen et al., 2010).

1.4 La propagation des gènes de résistance

Nous avons vu que l'antibiorésistance est un phénomène naturel et que les mécanismes mis en place sont essentiels à la survie et au développement d'un organisme. A l'heure actuelle, différents facteurs interviennent sur la dissémination des gènes liés à l'antibiorésistance. Tout d'abord, il y a des facteurs physiques et naturels comme le vent et les milieux aquatiques pouvant transporter des bactéries présentant des résistances sur de grandes distances. De même, il se peut que des bactéries vivant uniquement en milieu terrestre puissent être transportées d'un continent à l'autre, par exemple avec des tempêtes de sable (Allen et al., 2010).

Ces facteurs que l'on qualifiera de naturels ont aussi subi la pression d'éléments anthropophagique. En effet, il a été montré par une étude comparative, que l'air intérieur d'une maison présentait plus de souches d'*Escherichia coli* résistantes que l'air extérieur. L'homme a aussi influencé le microbiome des animaux sauvages, plusieurs études ont comparé les bactéries résistantes retrouvées sur des animaux à travers deux pays. Par exemple, des études sur des souches d'*E. coli* isolées d'animaux sauvages ont montré une plus grande fréquence de résistance aux antibiotiques au Mexique qu'en Australie. Les oiseaux migratoires parcourent de nombreux kilomètres et divers écosystèmes au fil des saisons, leur proximité avec les hommes a engendré une augmentation du nombre de bactéries résistantes associées aux oiseaux sauvages (Allen et al., 2010).

Cette activité humaine est bien le principal facteur influençant ce phénomène, par exemple les voyages permettent des transferts intercontinentaux de bactéries résistantes. La médecine moderne et l'agriculture sont deux causes majeures du développement de résistance chez les bactéries. Ces deux points étant très importants, ils seront développés dans la suite du mémoire. Pour se rendre compte de l'impact de l'homme sur la présence de bactéries résistantes, des études ont été menées sur des populations humaines isolées et des populations vivant proches des villes. Le résultat est que l'on retrouve la présence de gènes liés à la résistance aux antibiotiques chez tous les types de populations. Pour une population isolée, sans médecine développée, un contact minimal avec des populations extérieures a permis l'apparition d'une panoplie de gènes de résistance (Allen et al., 2010). Les différentes sources d'antibiotiques et facteurs jouant sur leurs propagations sont résumés sur la figure 1.5.

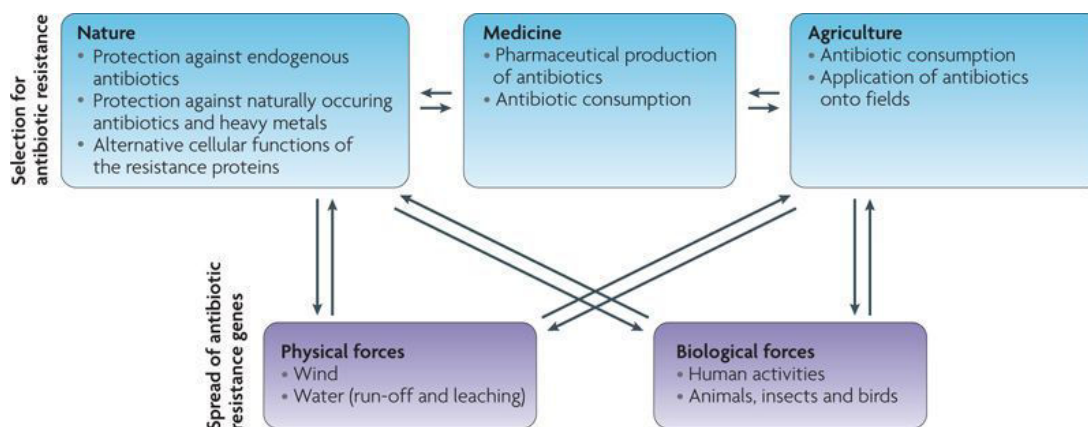


Figure 1.5 : Sources et mouvement des gènes de résistance aux antibiotiques dans l'environnement (Allen et al., 2010).

1.5 Impact de l'homme sur la résistance aux antibiotiques

1.5.1 Une augmentation dramatique de ce phénomène

Depuis la découverte de la pénicilline et de sa mise sur le marché, les antibiotiques ont fait évoluer notre médecine et notre société. Ces médicaments nous permettent de vivre plus sereinement au quotidien et de pouvoir pratiquer des procédures de chirurgie médicale plus facilement (césarienne, chirurgie de l'intestin, traitements qui affectent le système immunitaire comme la chimiothérapie) (O'Neill, 2016). Nonobstant leur indéniable efficacité, l'humanité a massivement utilisé ces composés aboutissant aujourd'hui à une émergence de résistances chez de nombreuses bactéries pathogènes ou non. Une première surutilisation concerne la santé humaine. En cas d'infections bactériennes un patient peut recevoir un traitement, qui, s'il n'est pas suivi entièrement, va permettre le développement de résistances chez des bactéries qui rejoindront par la suite les eaux usées. Pour limiter cela, un meilleur diagnostic doit être établi pour cibler efficacement le pathogène et dans le même temps limiter l'automédication. Par ailleurs, un patient peut séjourner à l'hôpital, un lieu riche en bactéries résistantes dues aux différentes pathologies, être au contact de ces dernières et les propager dans l'environnement (Figure 1.6). Le deuxième facteur majeur est l'utilisation d'antibiotiques dans l'agriculture et en santé animale. Pendant de nombreuses années, les antibiotiques ont été quotidiennement utilisés comme facteur de croissance animal. Ces derniers vont donc être retrouvés dans tous les produits de consommation d'origine animale, et dans les fèces qui seront utilisées par la suite pour des cultures agricoles (Figure 1.6). Nous sommes aujourd'hui témoins d'un processus évolutif, intensifié par une influence anthropogique plutôt que par l'évolution naturelle et aléatoire des bactéries (Davies and Davies, 2010).

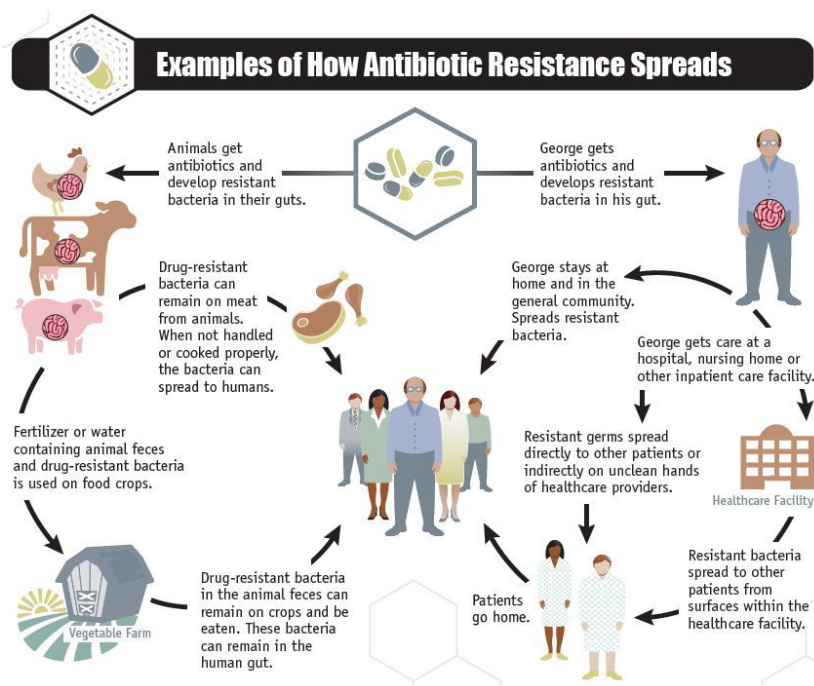


Figure 1.6 : Dissémination des bactéries résistantes par l’homme (Centers for Disease Control and Prevention, 2018a).

1.5.2 Les prédictions

Depuis les années quarante, de nombreux antibiotiques ont été mis sur le marché (petites molécules naturelles ou de synthèses), cependant si l’on regarde les dates de mises sur le marché et l’apparition des premières résistances le délai moyen est d’environ un an. Une liste non exhaustive des grandes classes d’antibiotiques et de leur apparition est donnée en Figure 1.7. Cela fait environ dix ans qu’aucun nouvel antibiotique n’a été introduit sur le marché, cela s’explique par le fait que l’investissement pour le développement d’un médicament, avec une potentielle durée de vie sur le marché courte, n’est pas rentable. Entre 2003 et 2013 l’investissement des sociétés pharmaceutiques dans la recherche d’antimicrobiens ne représentait que 5 % du total (O’Neill, 2016). L’investissement dans l’oncologie, apparaît plus lucratif (World Health Organization, 2015a).

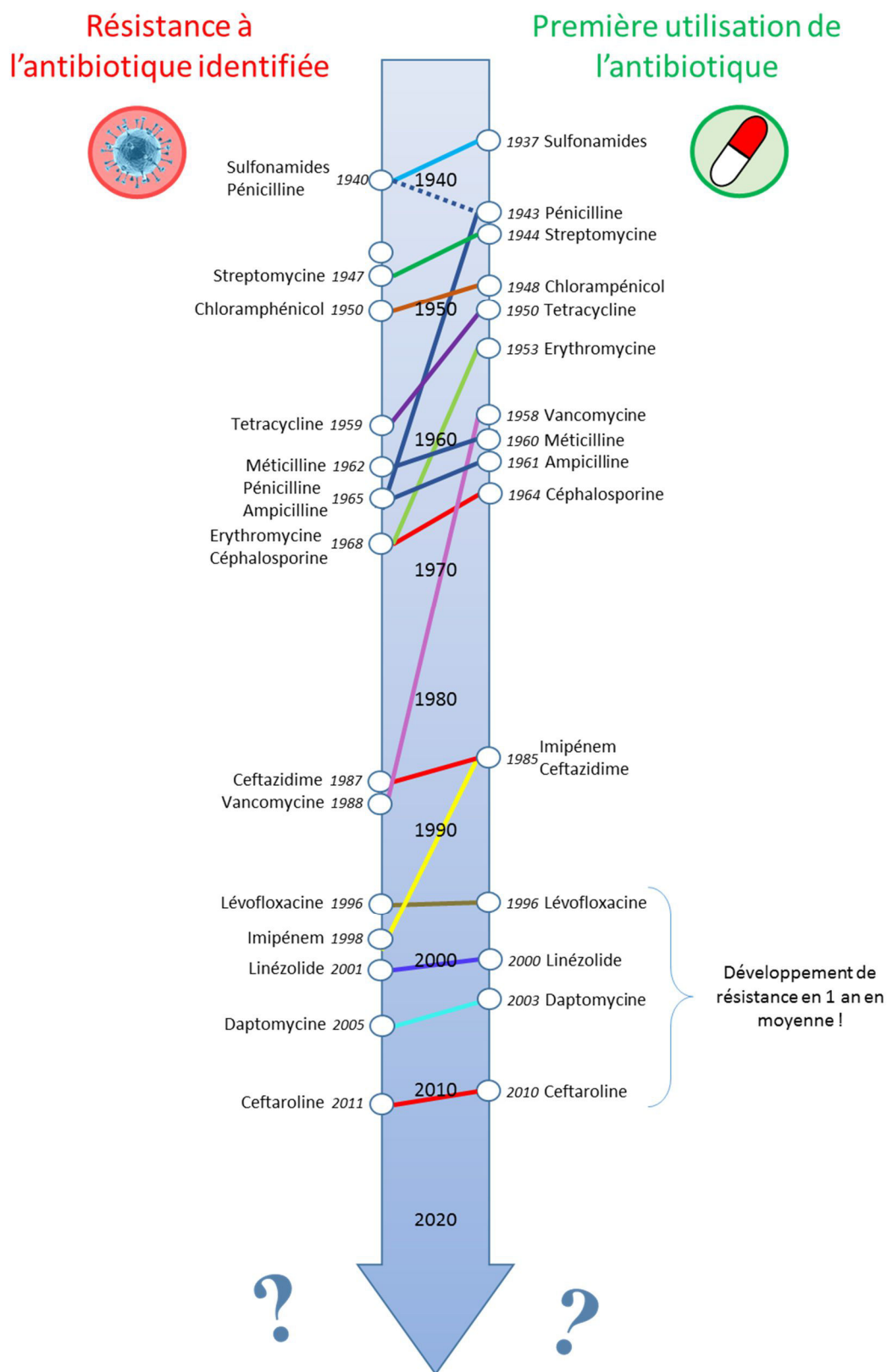


Figure 1.7 : Chronologie de la mise sur le marché des antibiotiques et apparition de la résistance (adaptée de Clatworthy, Pierson and Hung, 2007; Centers for Disease Control and Prevention, 2018c).

L'importance du problème est maintenant comprise. Les estimations prévoient que d'ici 2050, les morts liées à la résistance aux antibiotiques concerneront 10 millions de personnes (700 000 aujourd'hui) et engendreront un coût supérieur à cent mille milliards de dollars (traitement plus coûteux, frais hospitaliers, absence au travail...) (O'Neill, 2016) (Figure 1.8). En 2018 Sanofi et Evotec ont conclu un accord pour regrouper leurs activités en recherche et développement liées aux maladies infectieuses (hors vaccins), afin de renforcer la plateforme R&D basée à Lyon (Ducruet, 2018).

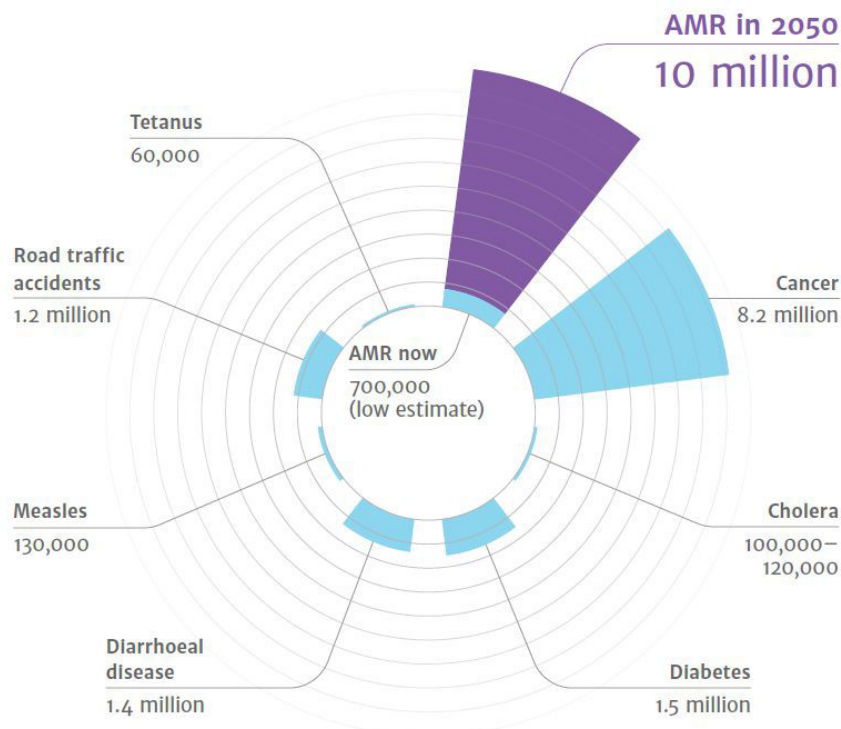


Figure 1.8 : Prédiction du nombre de morts liées à la résistance aux antibiotiques d'ici 2050 (O'Neill, 2016).

1.6 Les centres de contrôle et systèmes de surveillance

A travers le monde, plusieurs centres de contrôle sont à la recherche de chaque nouvelle infection causée par un micro-organisme, dans le but de prévenir une possible dissémination des infections résistantes aux antibiotiques. Entre autres, voici les principales organisations de surveillance :

- Le système mondial de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (GLASS) mis en place par l'OMS depuis 2015. Son but est de récolter, au niveau mondial, les données cliniques et épidémiologiques et de laboratoires sur différents agents pathogènes représentant une réelle menace pour la santé et de contrôler au mieux les souches infectieuses. Ses données sont utilisées pour soutenir les actions à différentes échelles (mondiale à régionale) (World Health Organization, 2015a).

- Les Nations Unies ont proposé un groupe de coordination (IACG) afin d'améliorer la coordination entre les institutions internationales pour proposer un plan global d'action plus efficace.
- Au niveau européen on retrouve le réseau de surveillance européen de la résistance antimicrobienne (EARS-Net) géré par le Centre Européen de prévention et contrôle des maladies. On peut rajouter à ce réseau le centre de surveillance des résistances antimicrobiennes d'Asie et d'Europe de l'est (CAESAR) pour agir et supporter les pays n'appartenant pas au réseau EARS-Net.
- Au niveau américain, le centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) est aussi un acteur important sur le continent. Ce centre propose la solution « Initiative aux Résistances Antimicrobiennes » (AR Solution Initiative), plan consistant à investir dans les infrastructures pour prévenir les infections résistantes à travers la société, la nourriture et les installations médicales

Toutes ces organisations partagent des objectifs communs, elles visent une meilleure compréhension de l'antibiorésistance, développer la recherche et la surveillance des pathogènes résistants, optimiser l'utilisation des antibiotiques et développer un système économique durable pour la découverte de nouveaux moyens efficaces de lutte contre ces pathogènes (The Regional Office for Europe of the World Health Organization, 2017; World Health Organization, 2015a, 2017).

En plus de ces systèmes de surveillance l'OMS a aussi mis en place un partenariat global sur la recherche et le développement d'antibiotiques (GARDP) afin de favoriser les relations public-privé. Ce partenariat a pour objectif d'établir quatre nouveaux traitements d'ici 2023. Enfin, pour sensibiliser la population mondiale à ce sujet, l'OMS a mis en place la semaine mondiale pour le bon usage des antibiotiques qui a lieu au mois de novembre depuis 2015.

1.7 Souches prioritaires résistantes aux antibiotiques

L'OMS a publié en 2017 une première liste de pathogènes prioritaires menaçant fortement la santé humaine (World Health Organization, 2015b). Le CDC a fait la même chose sur le territoire américain en 2013 (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). Il est important de noter que ces deux listes sont différentes, se basant sur différents critères mais les deux sont validées par des comités d'experts. Dans ce mémoire, je développerai les bactéries présentant une priorité critique pour notre société moderne.

Acinetobacter baumannii, résistant au carbapénème

A. baumannii est une bactérie à Gram négatif pouvant affecter les personnes avec un système immunitaire affaibli. Ce micro-organisme est exclusivement trouvé dans les milieux hospitaliers où on le retrouve lié aux infections nosocomiales et infections sanguines. Son taux de mortalité peut atteindre 35 % (Antunes et al., 2014).

Pseudomonas aeruginosa, résistant au carbapénème

P. aeruginosa est aussi une bactérie à Gram négatif provoquant des maladies chez les plantes et les animaux. Ce pathogène est considéré comme opportuniste. En effet les infections sévères sont liées à une autre maladie comme la mucoviscidose, les brûlures importantes ou aux patients immunodéprimés. Aujourd'hui, *P. aeruginosa* est responsable de 51 000 infections par an aux Etats-Unis (Bassetti et al., 2018).

Enterobacteriaceae, résistant au carbapénème et céphalosporine 3ème génération

Les *enterobacteriaceae* sont elles aussi des bactéries à Gram négatif, cette famille de bactéries tue la moitié des patients qui ont une infection sanguine dont elle est responsable. Il a été établi que ces infections sont associées à des taux de morbidité et mortalité importants (Figure1.9) (Logan, 2012).

MDR *Neisseria gonorrhoeae*

N. gonorrhoea, une autre bactérie à Gram négatif causant la gonorrhée, une maladie sexuellement transmissible pouvant résulter en une inflammation de l'urètre, du col de l'utérus, du pharynx ou du rectum. On dénombre aux Etats-Unis plus de 800 000 infections par an (Figure1.9) (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

Clostridium difficile

C. difficile est une bactérie à Gram positif causant des diarrhées mortelles. Ces infections apparaissent souvent chez les patients sous traitement médical et/ou, antibiotique. Elles représentent 14 000 morts par an aux Etats-Unis pour un coût médical d'un milliard de dollars. Le nombre de morts liées à ce pathogène a augmenté de 400 % entre 2000 et 2007 (Figure1.9) (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

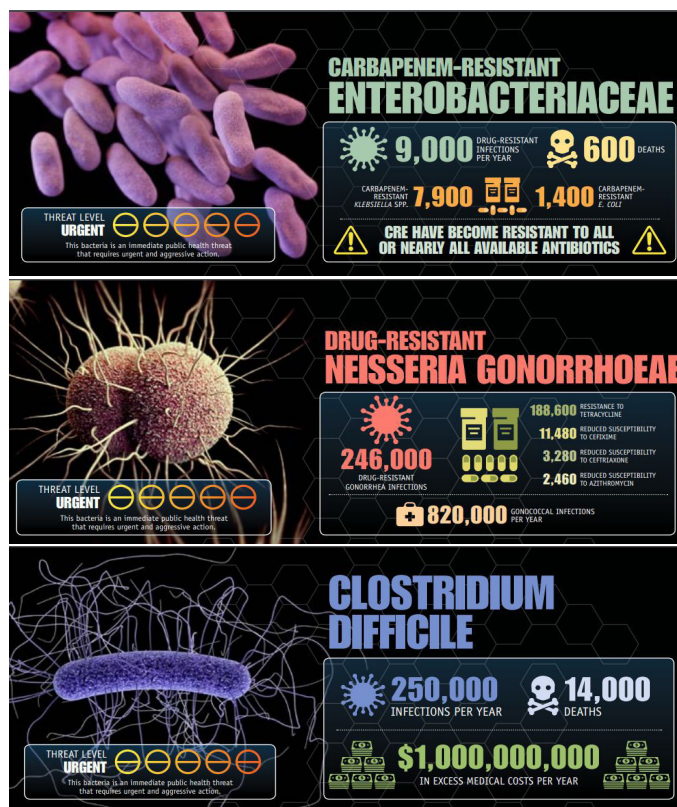


Figure 1.9 : Statistiques de trois pathogènes dont la priorité est critique selon le CDC (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

1.8 L'approche One Health

Depuis le début du 21^{ème} siècle, beaucoup de virus zoonotiques (transfert de l'animal vers l'homme), engendrant possiblement des maladies mortelles pour l'homme ont été responsables d'épidémies internationales. Pour mieux prévenir et gérer ces virus, le concept One Health a été mis en place afin d'améliorer l'interdisciplinarité et collaborations entre experts médicaux et scientifiques (Gibbs, 2014). Cette approche a pour but d'unifier la santé publique, animale et environnementale : « nous avons un monde, une seule santé ».

Cette approche a dans un premier temps été mise en place pour éviter le transfert de virus pathogènes de l'animal vers l'homme. Il se trouve que 60 % des maladies infectieuses chez l'homme seraient d'origine animale (Direction générale de la mondialisation, du développement et des partenariats, 2011). Ce concept a donc été étendu aux micro-organismes (bactéries) résistants aux médicaments et en particuliers aux antibiotiques. Les bactéries multirésistantes peuvent se transmettre de l'homme à l'animal et inversement, soit par un contact direct ou par la consommation de produits provenant d'animaux contaminés. La santé environnementale est aussi à prendre en compte, en effet à travers la pollution, les contaminations, les changements climatiques, certaines classes de pathogènes peuvent se répandre plus facilement dans le monde. Ce concept vise donc à promouvoir les projets interdisciplinaires et à améliorer le partage de l'information

dans le but d'améliorer la prévention des maladies infectieuses et la mise en place de nouveaux traitements (Gibbs, 2014) (Figure 1.10).

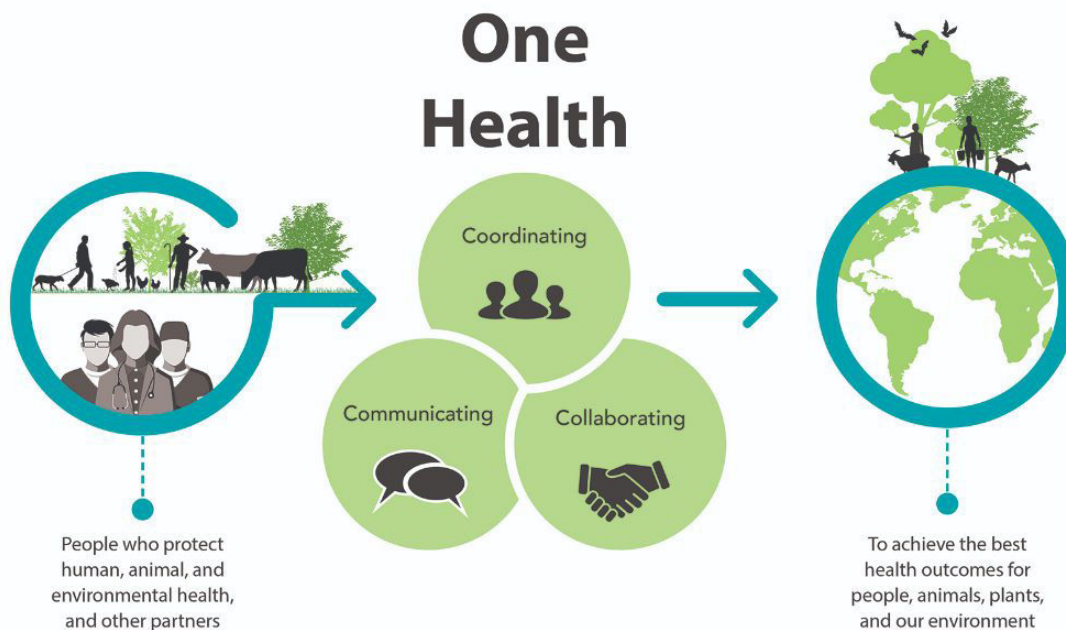


Figure 1.10 : Le concept One Health

1.9 Traitements contre les bactéries multirésistantes

1.9.1 Maintenir la vie thérapeutique des antibiotiques actuels

Pour commencer, il faut améliorer la compréhension globale sur ce sujet pour éviter l'utilisation et les prescriptions abusives des antibiotiques (O'Neill, 2016). Pour réduire l'usage inutile et éviter la dissémination d'antibiotiques dans l'environnement, il faut se focaliser sur le secteur agricole (et aussi celui de l'aquaculture). En effet, l'utilisation abusive des antibiotiques comme facteurs de croissance a un impact très important sur l'apparition de nouvelles souches résistantes. Interdire l'utilisation des antibiotiques quand ils ne sont pas à visée thérapeutique est une possibilité à étudier, comme l'a fait la commission européenne en 2006 (Commission Européenne, 2005). Aux Etats-Unis, plus de 70 % des antibiotiques définis comme importants pour l'homme sont utilisés pour les animaux (O'Neill, 2016). Pour éviter l'usage inutile en médecine, il faut continuer à améliorer les systèmes de surveillance mis en place et surtout promouvoir des diagnostics nouveaux et rapides. Il est conseillé aux nations développées de mettre en place un système interdisant la prescription d'antibiotiques sans données cliniques (O'Neill, 2016). A ce jour 50 % des antibiotiques prescrits en médecine humaine sont considérés comme inutiles (Holmes et al., 2016).

Précédemment, les différents modes de résistances ont été abordés. Les systèmes développés par chaque bactérie sont liés au mode d'action de l'antibiotique. Une approche combinatoire d'antibiotiques avec différents modes

d'actions peut être intéressante pour empêcher l'apparition rapide de la résistance. Cette approche a connu des succès cliniques pour des infections liées au cancer et au sida. Cependant pour le moment, cette stratégie n'est pas transposable à une maladie directement provoquée par des souches bactériennes (Holmes et al., 2016).

Une autre approche consiste à mettre en place une utilisation cyclique des antibiotiques. Pendant une période de temps on favorise certains antibiotiques tout en mettant en place une période de restriction pour d'autres molécules. L'idée de cette stratégie est que pendant les phases de restriction, la bactérie ne rencontrant pas d'antibiotiques, la résistance provoquée par ces derniers diminue. Ceci est à relier au coût énergétique que les mécanismes de résistance demandent aux cellules. Cependant il se peut que ces périodes soient très longues et il est difficile de prédire ce phénomène aléatoire de disparition de la résistance (Beardmore et al., 2017).

1.9.2 Développer de nouveaux traitements

Nous retiendrons de ce chapitre le côté critique de la résistance aux antibiotiques et qu'à différents niveaux nous pouvons contribuer à l'amélioration de la situation. Aux côtés des centres de surveillance et des actions de communication pour sensibiliser le grand public, la priorité pour lutter contre ce problème de santé publique majeur est le développement de nouveaux traitements et moyens de lutte contre les souches résistantes.

A l'heure actuelle, différents grands axes de recherche se dégagent. Le premier est la recherche de vaccins, un traitement qui permettrait la prévention des infections chez l'homme et les animaux et qui serait une alternative potentielle à l'utilisation d'antibiotiques. Une autre voie envisagée est la phagothérapie, l'utilisation de virus (bactériophages) pour éliminer les bactéries infectieuses. Suite à la mise sur le marché des antibiotiques dans les années quarante, entraînant l'âge d'or de ces derniers, ce type de traitement a été oublié des pays occidentaux. Enfin, une dernière voie concerne la découverte de nouvelles molécules à propriétés antimicrobiennes. Depuis plusieurs années, le monde de la recherche s'intéresse fortement aux peptides antimicrobiens (PAM), qui sont des macromolécules naturelles. Nous développerons dans le chapitre suivant ces stratégies et en particulier le potentiel des peptides antimicrobiens. Les PAM constituent l'axe principal des travaux décrits dans ce mémoire.

Chapitre 2 : Le développement de nouveaux traitements

L'émergence de bactéries résistantes et multirésistantes aux antibiotiques présente un réel danger pour notre société. Nous avons vu que d'ici quelques dizaines d'années cela pourrait avoir des conséquences désastreuses sur notre vie quotidienne. Il est donc nécessaire de développer et de mettre en place de nouveaux traitements pour lutter contre ces pathogènes mais aussi pour diminuer et contrôler le phénomène d'antibiorésistance. Les listes établies par l'OMS et le CDC permettent de cibler les pathogènes présentant une réelle menace pour l'Homme. Par manque de rentabilité, la barrière économique est un des problèmes majeurs au développement de nouveaux moyens thérapeutiques.

Cependant avec la mise en place des différents centres de contrôles et les partenariats public-privé, davantage de fonds sont mobilisés permettant de promouvoir la recherche dans ce domaine. Que ce soit par des start-ups ou des grandes entreprises, plusieurs traitements sont aujourd'hui en voie de développement. Nous allons aborder dans cette partie, différentes pistes, notamment les vaccins, la phagothérapie et les peptides antimicrobiens.

2.1 Les vaccins

2.1.1 Le potentiel des vaccins

L'émergence des souches résistantes est due à l'utilisation d'antibiotiques dit à spectre large, efficaces contre un grand nombre de bactéries et pouvant être délivrés sans un diagnostic permettant de déterminer le pathogène responsable de la maladie. L'utilisation d'antibiotiques spécifiques d'une souche en particulier est plus difficile à mettre en place. En effet après une période d'analyse pour identifier le pathogène, le patient devra essayer plusieurs traitements spécifiques jusqu'à ce que sa condition s'améliore, rendant ainsi le traitement plus lourd et long. Les vaccins représentent un véritable changement dans ce paradoxe, ils permettent de prévenir de la maladie et sont spécifiques d'une espèce bactérienne (Figure 2.1) (Jansen et al., 2018).

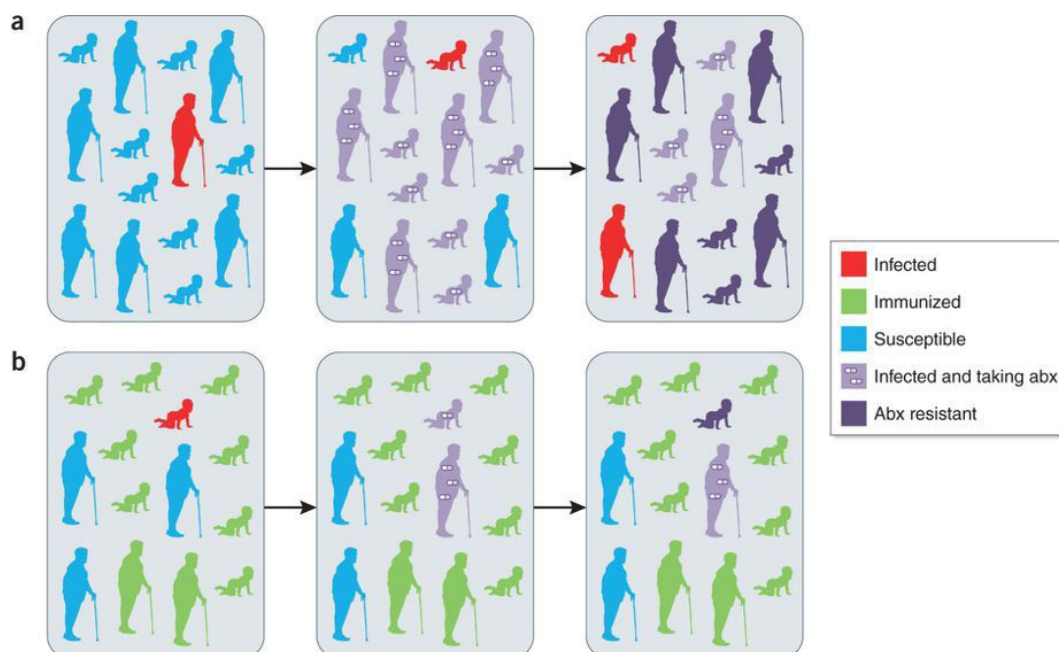


Figure 2.1 : Effet de la vaccination sur la dissémination d'un pathogène. **a** Situation d'une population sans vaccin, l'usage d'antibiotiques pour lutter contre les infections favorise l'apparition de résistance. **b** Situation d'une population préalablement immunisée, la dissémination du pathogène est limitée (Jansen et al., 2018).

Le principe d'un vaccin est d'entraîner le système immunitaire à reconnaître et agir contre un pathogène par une réponse immune rapide et efficace. Les vaccins seront aussi un avantage pour les personnes ne pouvant pas être immunisées, par exemple les personnes immunodéprimées dans le cas d'une chimiothérapie. Cet effet est appelé l'immunité de troupeau (Figure 2.2). Cela repose sur le fait que lorsque de nombreuses personnes sont immunisées contre un pathogène au sein d'une population, la fréquence de transfert de ce dernier entre personnes sera diminuée entraînant ainsi une diminution d'utilisation d'antibiotiques et affectera directement l'apparition de souches résistantes (Jansen et al., 2018).

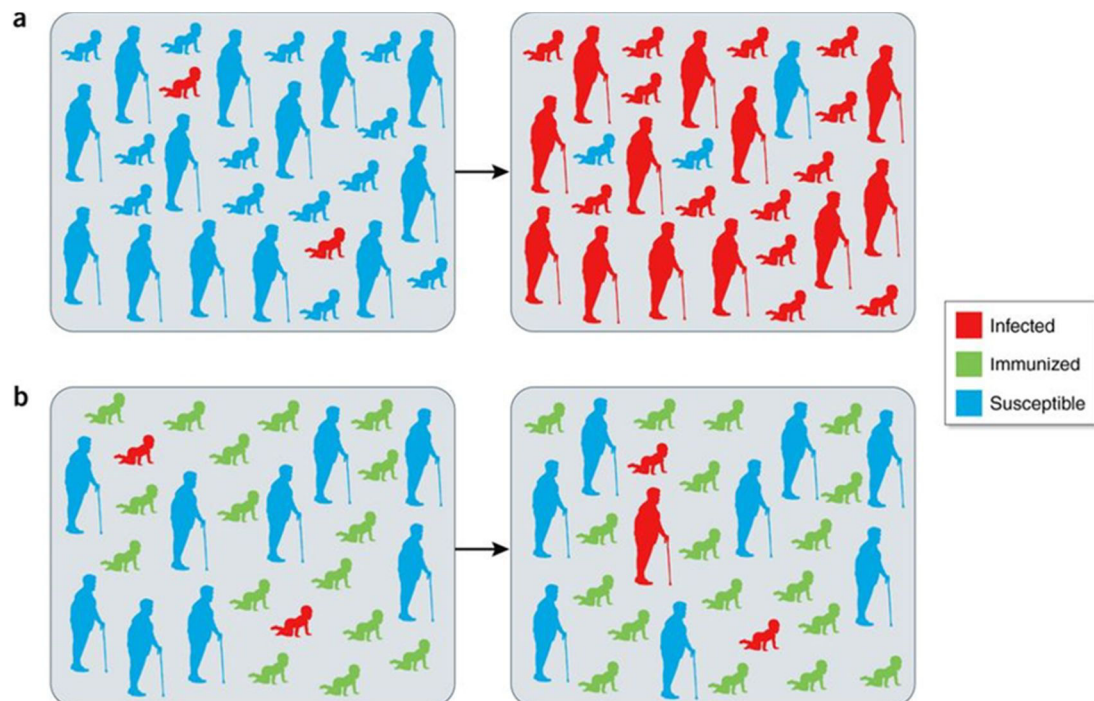


Figure 2.2 : Effet d'immunisation de troupeau. **a** Population non vaccinée, le pathogène se répand facilement à travers la population. **b** Population vaccinée, le transfert du pathogène est limité, protégeant les personnes immunodéprimées (Jansen et al., 2018).

Nous avons vu que depuis une dizaine d'années, aucun nouvel antibiotique n'était arrivé sur le marché et que les dernières molécules étaient rapidement devenues obsolètes, obligeant ainsi la recherche permanente de nouveaux traitements. La vaccination a le bénéfice d'être durable sans générer de résistance importante. Ceci peut être dû au fait que les vaccins visent un nombre restreint de pathogènes en les ciblant de plusieurs manières, obligeant le pathogène à développer plusieurs mécanismes de résistances (Bloom et al., 2018).

Le premier type de vaccin antibactérien efficace à la fois dans la prévention de la maladie et dans la diminution de l'utilisation d'antibiotique est celui contre *Haemophilus influenzae* type b (Hib vaccines), une des causes les plus courantes de méningite bactérienne chez les enfants. Développé dans les années soixante, ce vaccin repose sur le pouvoir antigénique des polysaccharides de la capsule de Hib conjugué à des protéines cargos. L'entrée de ce type de vaccin sur le marché canadien a divisé par trois le nombre de maladies liées à Hib en 20 ans et une élimination de la maladie chez les enfants au Royaume-Uni. En complément, une diminution significative des souches présentant des β -lactamases, mécanisme de résistance principal de Hib, a été observée (Jansen et al., 2018).

Les vaccins viraux ont aussi un rôle important dans l'antibiorésistance. En effet les vaccins contre *Influenza* ne préviennent pas seulement les gripes saisonnières, mais vont par la même occasion diminuer la probabilité de déclencher une infection secondaire, comme une pneumonie ou une otite aigüe. En Turquie,

l'apparition d'otite aigüe a été réduite de 50,9 % chez les enfants vaccinés. Le second bénéfice de ce type de vaccin, est la diminution de l'utilisation d'antibiotiques pour traiter les maladies des voies respiratoires qui sont souvent liées à des virus. Aux Etats-Unis, la moitié des prescriptions d'antibiotiques pour ce genre de maladies sont inappropriées (Jansen et al., 2018).

2.1.2 Les vaccins en développement

Le développement d'un vaccin est un processus long devant répondre à certaines exigences. La première est de prendre en compte la prévalence de la maladie. De plus, il faut avoir une compréhension de la réponse immunitaire pour protéger contre un pathogène particulier afin de façonner le vaccin. A cela, il faut ajouter que la formulation médicamenteuse doit être stable. Enfin, il faut identifier une population sur laquelle on pourra tester le vaccin en développement. A ce jour, plusieurs vaccins, contre des pathogènes prioritaires, sont en phase de développement clinique (Tableau 2.1) (Jansen et al., 2018).

Name	Developer	Pathogen	Status
PF-06425090	Pfizer	<i>Clostridium difficile</i>	Phase III
GSK-692342	GlaxoSmithKline/ Areas	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Phase II
Group B <i>Streptococcus</i> vaccine, maternal immunization	GlaxoSmithKline	Group B <i>Streptococcus</i>	Phase II
PF-06290510	Pfizer	<i>Staphylococcus aureus</i>	Phase II
JNJ-63871860	Johnson & Johnson	Extra-intestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i>	Phase II

Tableau 2.1 : Exemples de vaccins en cours de développement clinique (Kingwell, 2018).

Prenons par exemple les vaccins visant les infections à *C. difficile*. Ces infections sont le résultat de toxines produites par le pathogène. Ces toxines peuvent être neutralisées et injectées sous forme de vaccin afin de préparer le système immunitaire à une infection à *C. difficile*. Le mécanisme d'action précis de ces toxines n'est pas encore totalement élucidé, cependant, nous trouvons de nombreux succès concernant les vaccins à base de toxines neutralisées (tétanos, diphtérie, anthrax). A ce jour un vaccin est en phase 3 de développement clinique, une fois l'autorisation de mise sur le marché obtenue, un déclin dans la propagation de souches de *C. difficile* résistantes sera envisageable (Jansen et al., 2018; Kingwell, 2018).

2.1.3 Les barrières à l'utilisation

Malgré le potentiel de certains vaccins, il reste de nombreux obstacles à leur diffusion mondiale et à leur utilisation. Dans les pays développés une grande partie de la population bénéficie d'un accès aux vaccins, cependant, au niveau mondial les chiffres sont significativement plus bas (entre 20 et 45 % de la population). Une

couverture globale impliquerait une mise sur le marché mondiale, un déploiement rapide pour les pays à haut taux de natalité, améliorer la logistique pour atteindre les régions reculées ou encore diminuer la réticence de la population vis-à-vis des vaccins. Par exemple, Vaccines Europes est une organisation qui fournit les informations sur les innovations et fabrications des vaccins afin de démontrer leur efficacité et sécurité à la population. Une prise de conscience mondiale du rôle des vaccins combinée à un accès facilité aurait un impact important sur la résistance aux antibiotiques (Jansen et al., 2018). Nonobstant leur fort potentiel, il faut comprendre que les vaccins doivent être combinés aux agents antibiotiques (actuels et futurs), à de meilleurs diagnostics et prescriptions, et connaissance du sujet, pour combattre la résistance aux antibiotiques (Figure 2.3). Seule une stratégie globale intégrant plusieurs paramètres devrait permettre de mener une lutte efficace contre l'antibiorésistance (Bloom et al., 2018).

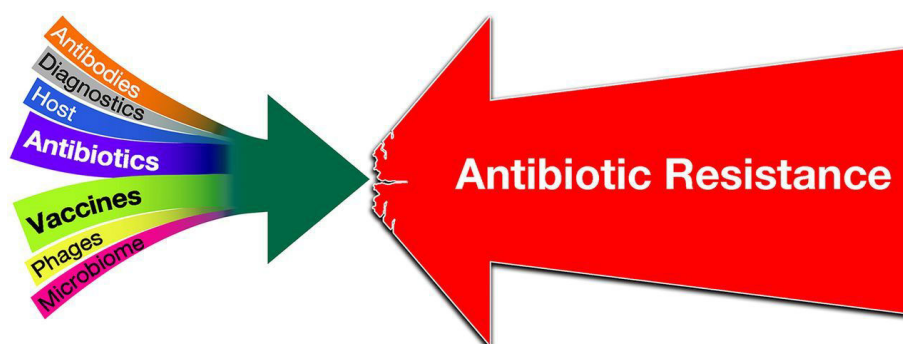


Figure 2.3 : Une stratégie globale pour combattre la résistance aux antibiotiques (Bloom et al., 2018).

2.2 La phagothérapie

Plus d'une décennie avant la découverte de la pénicilline, les bactériophages (ou phages) ont été découverts par deux scientifiques différents : Frederick Twort en 1915 et Félix d'Hérelle en 1917 (Doss et al., 2017). Les phages sont les organismes les plus importants, en nombre, sur Terre. Ce sont des virus pouvant infecter spécifiquement les bactéries, leurs hôtes naturels. D'Hérelle est à l'origine de l'utilisation des phages en thérapie, la première utilisation clinique remonte à 1919 pour traiter quatre cas de dysenterie bactérienne chez des enfants (Lin et al., 2017a). Ces premiers résultats prometteurs, ont été suivis par des tentatives de production aux Etats-Unis et au Brésil, cependant les essais cliniques qui ont suivis ont donné des résultats peu reproductibles, ce qui a diminué l'intérêt pour la phagothérapie. Avec l'émergence de l'âge d'or des antibiotiques l'étude des phages pour une utilisation en thérapie a été mise de côté en Europe de l'ouest et en Amérique. Des études ont continué au sein de l'Union soviétique et de l'Europe de l'est, qui utilise la phagothérapie pour traiter les infections aux bactéries résistantes de façon massive (Lin et al., 2017a).

2.2.1 Le cycle de vie d'un phage

La mise au point de la microscopie électronique et du séquençage génétique a permis l'étude de ces petites entités biologiques (25-200 nm en longueur), entraînant ainsi un net regain d'intérêt pour la phagothérapie depuis une vingtaine d'années (Doss et al., 2017; Lin et al., 2017a). Au même titre que les virus, les phages ont besoin de bactéries afin de se reproduire. D'un point de vue structural, les phages sont composés de deux parties principales : la capsid, contenant le matériel génétique et le corps, variant d'un phage à un autre, permettant l'interaction avec la bactérie cible et l'injection de matériel génétique (Figure 2.4) (Doss et al., 2017).

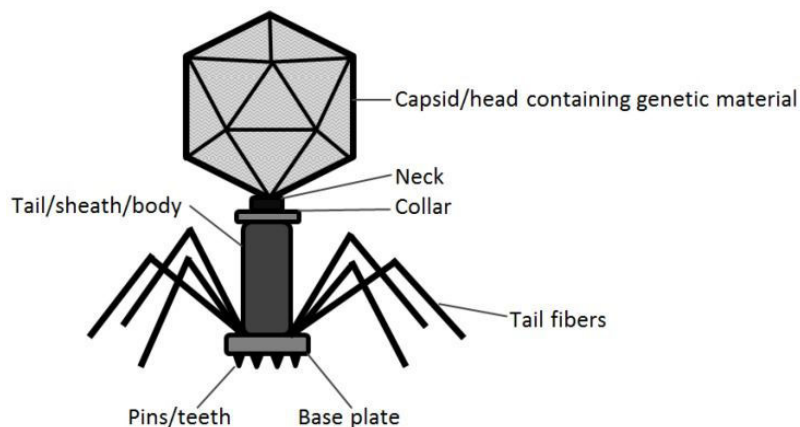


Figure 2.4 : Structure générale d'un phage (Doss et al., 2017).

Afin de se reproduire les phages peuvent rentrer dans deux cycles différents, un cycle lytique et un cycle lysogène (Figure 2.5). Les bactériophages vont se fixer sélectivement sur les bactéries à l'aide de récepteurs présents sur la surface de ces dernières et injecter le matériel génétique à l'intérieur. Au cours du cycle lysogène, l'ADN ou l'ARN du virus peut s'intégrer au génome de la bactérie, ce dernier devenant un prophage. A l'instar du génome il sera répliqué tout au long de la vie bactérienne et ce cycle lysogène peut durer indéfiniment jusqu'à ce que la bactérie soit exposée à un stress ou un environnement défavorable, provoquant la transition vers le cycle lytique et libération des virus. Au cours du cycle lytique, le virus utilise directement la machinerie cellulaire bactérienne afin de se reproduire. La production d'holines et d'endolysines va résulter en la dégradation des membranes bactériennes et à la libération des nouveaux phages (Doss et al., 2017). La phagothérapie conventionnelle repose donc sur les bactériophages ayant uniquement un cycle lytique, qui tuera directement les bactéries ciblées (Lin et al., 2017a). De plus, il a été mis en évidence que les phages lysogènes quand ils sont associés à une infection bactérienne diminuent la réponse immunitaire de l'hôte (Sweere et al., 2019).

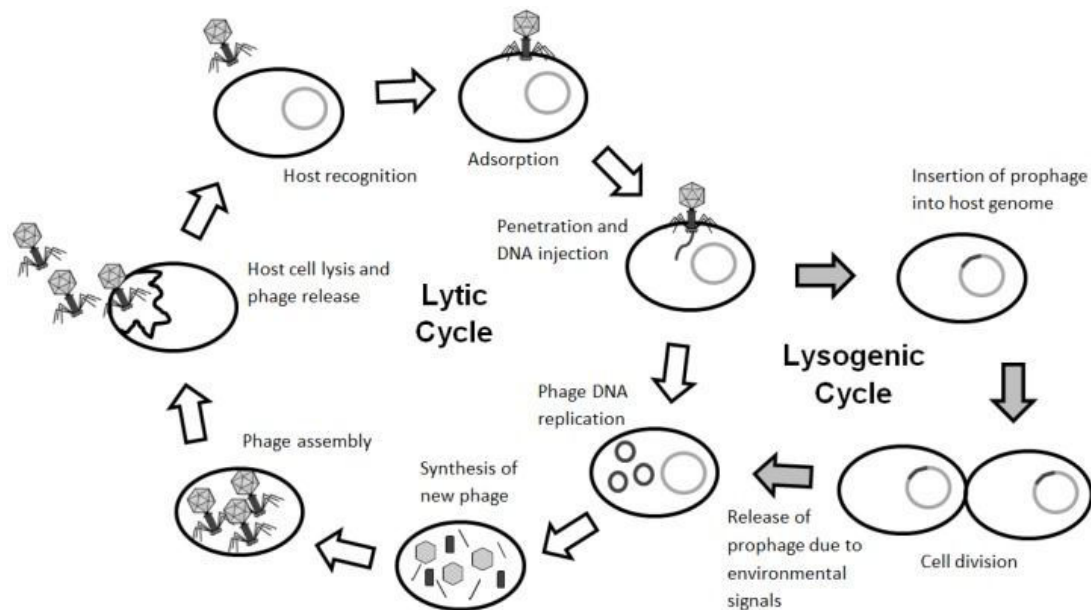


Figure 2.5 : Les cycles de reproduction des phages (Doss et al., 2017).

2.2.2 Les avantages de la phagothérapie

Comparée aux antibiotiques classiques, la phagothérapie présente certains avantages. Tout d’abord, les composés antibactériens peuvent avoir un effet bactériostatique, les phages ont forcément un effet bactéricide empêchant la résurgence de l’infection traitée (Saha and Mukherjee, 2019). Par ailleurs, les phages n’infectent pas les cellules eucaryotes, laissant une utilisation possible pour des thérapies humaines (Doss et al., 2017). D’un point de vue pratique, l’isolation des phages est un processus rapide simple et peu coûteux. Les phages vont continuer à se répliquer jusqu’à la réduction importante de la population bactérienne visée. Cette propriété est très intéressante, elle permettrait en théorie une administration unique de phages, évitant ainsi les administrations répétées d’antibiotiques et par conséquent les problèmes de surdosage, facteurs majeurs d’apparition de résistance (Saha and Mukherjee, 2019). De plus, les phages ont une très grande spécificité, avantage qui permettrait d’éviter un impact sur le microbiote humain, effet secondaire important des molécules thérapeutiques utilisées. Un autre avantage des phages, est leur capacité à inhiber les biofilms. Certains phages sont capables de produire des hydrolases aboutissant à la dégradation du biofilm. Il a été montré que des cathéters traités par un hydrogel contenant des phages diminuait de façon significative la formation de biofilms par *Staphylococcus epidermidis*, réduisant ainsi le risque d’infections nosocomiales liées au matériel médical (Saha and Mukherjee, 2019).

2.2.3 Les défis actuels

Derrière ces qualités, les phages présentent de véritables challenges à relever. Le premier point à prendre en compte est que les bactéries peuvent aussi développer des mécanismes de résistances aux phages, cependant ces derniers sont dix fois plus lents à se développer que pour la résistance aux antibiotiques (Doss et al., 2017). Un autre problème est le traitement des pathogènes intracellulaires, pénétrant les cellules humaines (type *Salmonella*), qui seraient inaccessibles aux phages qui n'ont pas la capacité d'interagir avec les cellules eucaryotes. Ce verrou pourrait être dépassé par l'utilisation de liposomes cationiques, transportant les phages et interagissant avec la membrane cellulaire (Saha and Mukherjee, 2019). Un troisième point concerne la détermination de l'effet des phages sur la réponse immunitaire humaine. Peu importe le mode d'administration, il est nécessaire d'étudier la clairance du phage employé. Pour une thérapie efficace le phage ne doit pas être éliminé par le système immunitaire rapidement (Saha and Mukherjee, 2019). Par ailleurs, nous avons vu au cours du chapitre un que les phages pouvaient être impliqués dans le transfert horizontal de gènes horizontaux au cours de la transduction. En transportant de l'ADN bactérien, les phages peuvent également transporter des gènes liés à la résistance aux antibiotiques et participer ainsi à leurs propagations. L'idéal serait d'utiliser des phages incapables d'encapsuler de l'ADN bactérien (Doss et al., 2017). La grande spécificité des phages peut aussi paraître problématique dans les cas d'infections multibactériennes. Cependant, ce problème peut être compensé par l'utilisation de cocktails de phages (Lin et al., 2017a). Enfin il faut s'intéresser à l'impact de la lyse bactérienne et en particulier des bactéries à Gram négatif avec libération d'endotoxine. Ce composé peut entraîner une réponse inflammatoire globale de l'hôte, le syndrome de réponse inflammatoire systémique, pouvant entraîner la mort (Doss et al., 2017).

2.2.4 Une utilisation combinée ?

Comme nous l'avons déjà mentionné, il n'y a pas une solution unique pour lutter contre la résistance aux antibiotiques. Une thérapie associant les phages et les antibiotiques pourrait présenter des avantages. Par exemple les phages, avec leurs propriétés anti-biofilms, faciliterait l'accès des antibiotiques aux bactéries pathogènes cibles et augmenterait l'activité de ces derniers (Saha and Mukherjee, 2019). Un autre point intéressant sur la thérapie phagique, est d'utiliser uniquement la machinerie du bactériophage pour entraîner la lyse bactérienne. Nous avons vu au cours du cycle lytique que le phage produisait deux grandes classes de protéines, les holines, s'accumulant dans les membranes bactériennes et les endolysines qui agissent directement sur la dégradation du peptidoglycane. La grande diversité des endolysines combinée à de l'ingénierie protéique devrait permettre de produire des enzymes efficaces contre les bactérie à Gram négatif (Saha and Mukherjee, 2019). L'utilisation des phages ou de leurs protéines, associée ou non aux antibiotiques peut être une voie de développement intéressante pour traiter des maladies infectieuses.

2.2.5 Le développement clinique

Depuis la découverte des phages, la recherche en phagothérapie a continué en Europe de l'Est. En particulier, des essais cliniques ont été menés par l'institut Eliava en Géorgie ou l'institut d'immunologie et de thérapie expérimentale à Wroclaw en Pologne. Par exemple, des patients diabétiques présentant des ulcères aux pieds ont été traités par des phages spécifiques de *Staphylococcus aureus* alors qu'ils ne répondaient pas aux antibiotiques classiques. Ce traitement a été suffisant pour rétablir les patients (Lin et al., 2017a). Avec l'urgence de trouver de nouveaux moyens pour lutter contre les bactéries résistantes, la phagothérapie a regagné un net intérêt ces vingt dernières années. On peut noter l'émergence de projets internationaux, avec l'étude Phagoburn qui vise à traiter les infections liées aux brûlures, par *E. coli* et *P. aeruginosa* (Saha and Mukherjee, 2019). Cependant, malgré les résultats positifs il est important d'établir des essais cliniques. En effet, les phages potentiellement utilisables en thérapie doivent répondre à un certain nombre de critères au cours des phases cliniques. Aujourd'hui, la barrière la plus importante est qu'il manque des tests cliniques adéquats pour ce type d'études (Furfaro et al., 2018). Il faut que ces tests répondent à des considérations pharmacologiques (dosage, mode d'application...) tout en regardant la stérilité et la non toxicité de la préparation phagique. La mise en place d'un cadre légal est essentiel pour l'introduction de la phagothérapie en Europe de l'Ouest et à travers le monde (Furfaro et al., 2018).

2.3 Les peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens sont présents chez tous les organismes et présentent une grande diversité structurale et fonctionnelle. Les PAMs sont des macromolécules relativement courtes (50 acides aminés maximum), chargés globalement positivement et de nature amphiphile. La littérature indique différentes classifications des PAMs en lien avec leurs structures globales (hélice α , feuillet β) ou leurs modifications post-traductionnelles par exemple (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Mahlapuu et al., 2016). Ces composés permettent aux organismes eucaryotes de se protéger des pathogènes et aux bactéries de survivre dans un écosystème riche et de participer aussi à la défense de son organisme hôte, soit par un effet direct sur les micro-organismes pathogènes, soit par un effet indirect en stimulant le système immunitaire de l'hôte (Chiu et al., 2017). Ces peptides possèdent un spectre d'activité antimicrobienne large incluant les bactéries à Gram positif et négatif, les champignons, les virus et les protozoaires unicellulaires (Mahlapuu et al., 2016). On peut classer les peptides antimicrobiens en deux grandes familles : ceux synthétisés par voie non ribosomale (NRPs pour *NonRibosomal Peptides*), produit majoritairement par les bactéries, et les peptides synthétisés par voie ribosomale et modifiés post-traductionnellement (RiPPs pour *Ribosomally and Post-translationally modified Peptides*), présent chez tous les organismes. Au cours de ce mémoire, les NRPs ne seront pas abordés, cependant il ne faut pas négliger leurs

potentiels avec par exemple la daptomycine (antibactérien), la bleomycine (antitumoral) ou encore la cyclosporine (antifongique et médicament immunodépresseur) qui sont disponibles sur le marché (Agrawal et al., 2017).

2.3.1 Les RiPPs

L'idée de cet écrit étant de discuter de l'intérêt et du potentiel des PAMs, je développerai certains exemples de RiPPs sans évoquer une classification particulière. Au contraire des NRPs, dont la synthèse requiert un complexe multi-protéique, leurs permettant d'intégrer des acides aminés non naturels dans leur structure, les RiPPs tirent leur grande diversité chimique de l'action d'enzymes sur un précurseur non modifié et préalablement synthétisé. Le peptide précurseur est généralement composé d'une séquence leader, qui sera coupée après la modification du cœur du peptide par les enzymes de maturation (Arnison et al., 2013) (Figure 2.6). Le peptide leader peut aussi contenir une séquence signal pour l'export du peptide et, ou, une séquence de reconnaissance nécessaire à la biosynthèse du peptide modifié (Arnison et al., 2013).

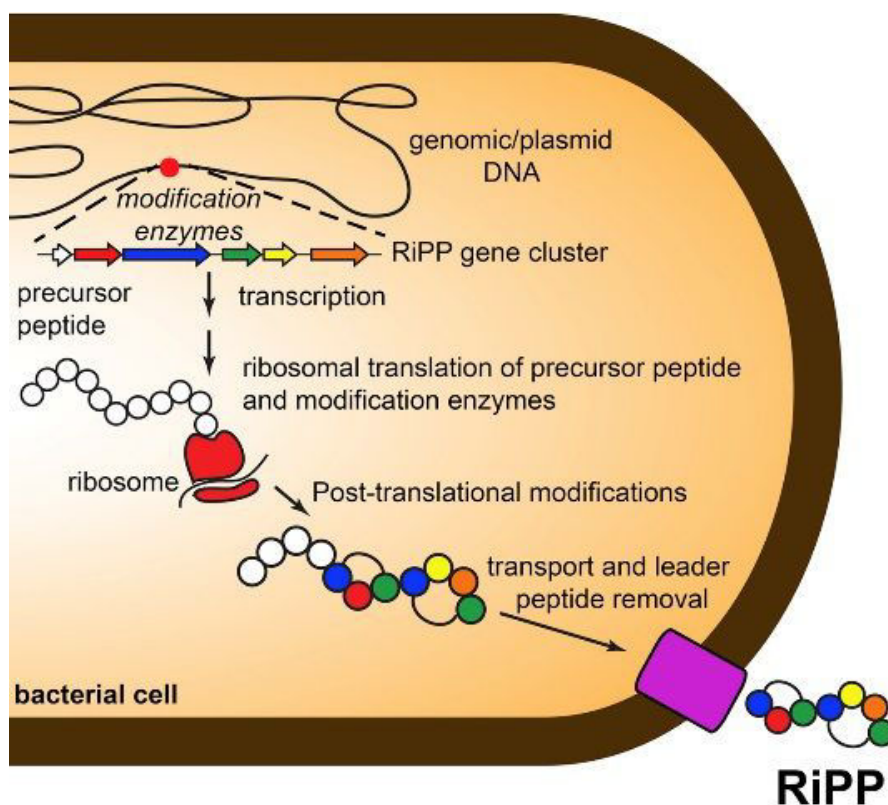


Figure 2.6 : Schéma de la voie générale de synthèse des RiPPs (Ortega and van der Donk, 2016).

La grande diversité structurale va permettre aux RiPPs d'avoir des activités antibactériennes, antifongiques, allélopathiques ou encore antivirales. Différents groupes de RiPPs ont été mis en évidence en lien avec leurs modifications chimiques telles que : des ponts thioéther (lanthipeptides et sactipeptides), des ponts

disulfures (cyclotides), des thiazoles et oxazoles (thiopeptides et cyanobactines), des structures 3D originales (peptides lasso) ou encore des ponts éthers (famille non définie (Clark et al., 2019)). La Figure 2.7 illustre à travers quelques exemples, la grande diversité des RiPPs. Les RiPPs représentent une source de composés chimiques au potentiel thérapeutique important et donc bénéfiques pour la santé humaine dans le contexte actuel. Ces dernières années, la recherche dans ce domaine a permis d'une part, de mettre en évidence des architectures chimiques différentes à fort potentiel thérapeutique, et d'autre part, la caractérisation des enzymes impliquées dans la modification de ces peptides, potentiellement utilisables en biologie de synthèse (Ortega and van der Donk, 2016).

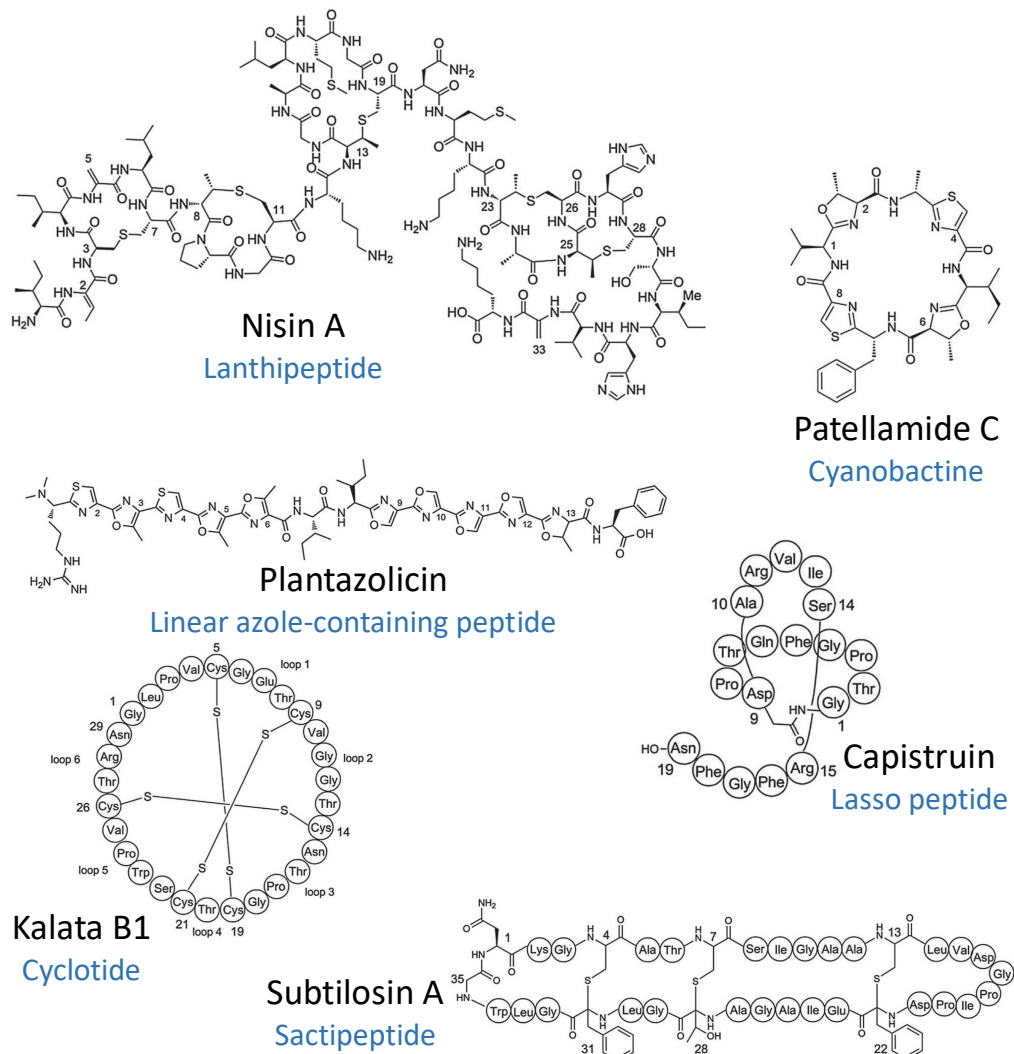


Figure 2.7 : Diversité chimique des RiPPs (adaptée de Arnison *et al.*, 2013).

Nous développerons dans les paragraphes suivants quelques classes de RiPPs, afin d'illustrer leurs voies de biosynthèses et leur potentiel antibactérien.

2.3.2 La nisine, modèle des lanthipeptides

L'activité antimicrobienne de la nisine a été reportée pour la première fois en 1928. L'élucidation de sa structure en 1971 a permis de mettre en évidence des acides aminés originaux, les lanthionines (Lan) et méthyl-lanthionines (MeLan) (Figure 2.7) (Arnison et al., 2013). La présence de ces motifs particuliers définit le groupe des lanthipeptides. La formation de ces acides aminés modifiés résulte d'un processus en deux étapes. Tout d'abord une déshydratation des chaînes latérales de sérine ou thréonine menant respectivement à la déhydroalanine (Dha) et à la déhydrobutyrine (Dhb), catalysée par une déshydratase (LanB). Ensuite, l'action d'une cyclase (LanC), permet une addition nucléophile d'une cystéine sur la double liaison nouvellement formée (addition de Michael) (Figure 2.8 a). Suivant les enzymes impliquées dans la biosynthèse, les lanthipeptides sont divisés en quatre groupes, ceux de classe I avec deux enzymes de maturations distinctes, la classe II encodant une enzyme unique (LanM) portant à la fois l'activité déshydratase et cyclase, et enfin les classes III et IV impliquant des enzymes de maturations à trois domaines (LanKC et LanL) (Figure 2.8 b). A noter que pour la classe III uniquement, l'enolate intermédiaire peut attaquer un autre résidu Dha pour former un motif labionine (Figure 2.8 a) (Hegemann and van der Donk, 2018).

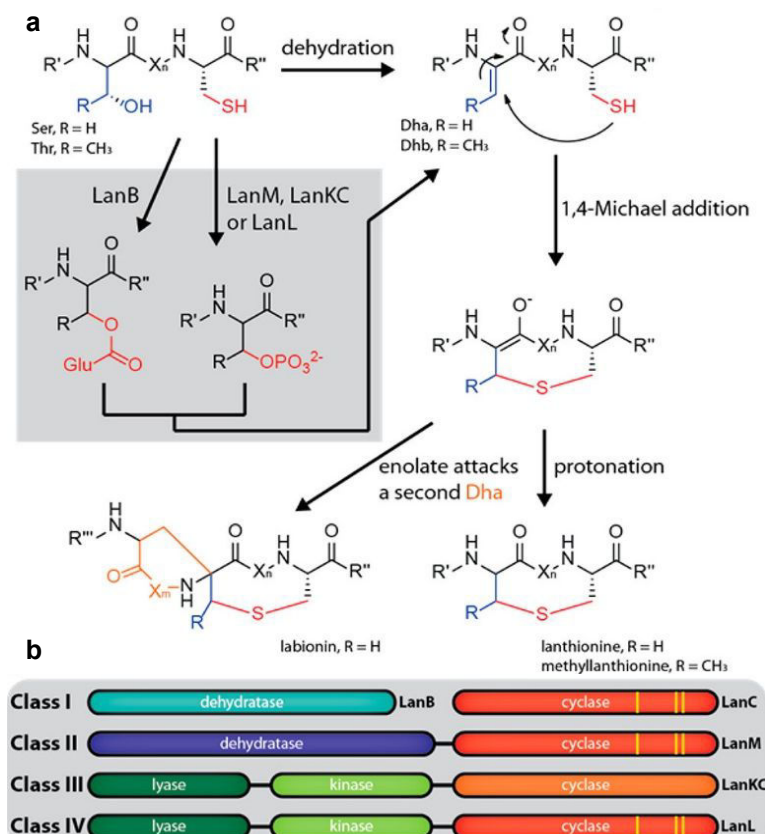


Figure 2.8: **a** Biosynthèse des lanthipeptides **b** Les différentes classes de lanthipeptides (adaptée de Hegemann and van der Donk, 2018).

La nisine appartenant à la classe I, est à ce jour le lanthipeptide, voir le RiPP, le plus étudié. La nisine a montré des effets antimicrobiens contre des bactéries à Gram positif. Ce peptide interagit avec le lipide II, précurseur dans la biosynthèse du peptidoglycane et donc de la paroi bactérienne, entraînant ainsi la formation de pore dans la membrane (Brötz et al., 1998). Dans les années soixante, un système de production de la nisine par fermentation de souches de *Lactococcus lactis* a été mis au point. Elle a été approuvée en 1988 par la FDA (Food and Drug Administration) en tant que conservateur alimentaire, que l'on retrouve dans le fromage, la viande et le poisson, empêchant par exemple la croissance de *Clostridium botulinum* dans les conserves. Suite au succès de la nisine et dans le but d'éviter d'autres contaminations alimentaires, en particulier par *Listeria monocytogenes*, pathogène commun présent dans l'environnement, la recherche dans le domaine des peptides antimicrobiens a connu un engouement important (Jones et al., 2005).

Bien que la nisine soit utilisée depuis les années quatre-vingt, des travaux sont fréquemment publiés sur ce lanthipeptide. L'utilisation de la nisine a inévitablement entraîné l'émergence de résistance chez des bactéries. De nombreuses études ont pour but de comprendre ces mécanismes de résistances. Par exemple chez *L. lactis*, ce sont des pompes d'efflux MDR qui sont impliquées dans la résistance tandis que chez des sous espèces de *Bacillus* on retrouve des Dha réductase, réduisant le Dha en alanine et rendant la nisine inactive (Sun et al., 2009). D'autres études portent sur l'activité biologique autre qu'antibactérienne de la nisine. Par exemple, il a été montré que l'étude de deux variants A et Z de la nisine (A et Z diffèrent d'un acide aminé en position 27, une histidine pour la nisine A et une asparagine pour la nisine Z), ont un effet cytotoxique, dose dépendent, sur des cellules HNSCC (carcinome), et donc un potentiel anticancéreux (Kaur and Kaur, 2015). Enfin des études visent à augmenter l'effet antibactérien de la nisine. On peut citer les travaux de Chang testant la nisine sous forme de nanoparticules. Ces dernières stables en milieu acide ont montré un effet antibactérien plus important que la nisine sous forme libre, contre *S. aureus* (Chang et al., 2018). Malgré l'apparition de résistance à la nisine, ces études montrent le fort potentiel de la nisine et ont permis d'identifier de nombreux lanthipeptides partageant ce potentiel.

2.3.3 Les peptides lasso

Les peptides lasso sont une classe de RiPPs caractérisée par une structure originale en forme de lasso. Ils sont produits généralement par des actinobactéries (*Streptomyces*, *Rhodococcus*) et quelques protéobactéries (*Escherichia*, *Burkholderia*). La structure résulte de la condensation du groupement amino N-terminal avec une chaîne latérale carboxylate d'un glutamate ou d'un aspartate aboutissant à un macrolactame. Cette réaction irréversible vient bloquer la queue C-terminale à l'intérieur du macrocycle donnant une structure compacte et stable, impossible à reproduire par synthèse (Arnison et al., 2013). Il a été montré qu'un complexe de deux enzymes intervient dans la biosynthèse de ces RiPPs (Duquesne

et al., 2007). La première enzyme est impliquée dans le clivage du peptide leader et la deuxième dans la cyclisation aboutissant à cette structure (Hegemann et al., 2015) (Figure 2.9).

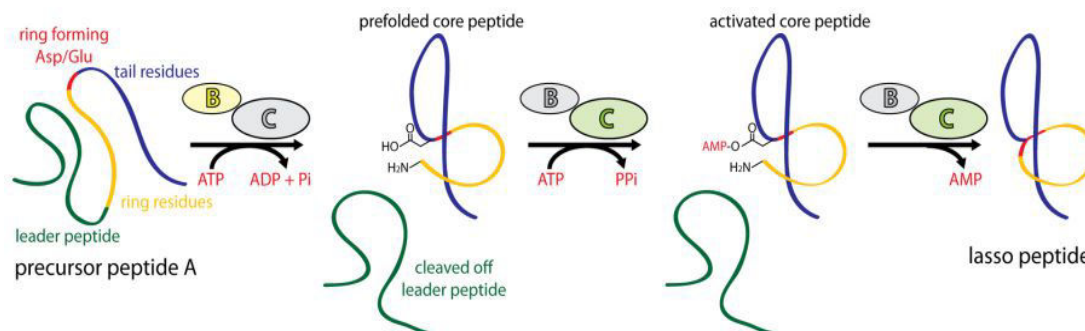


Figure 2.9 : Mécanisme général proposé pour la formation des peptides lasso (Hegemann et al., 2015).

On distingue trois classes de peptides lasso selon le nombre de ponts disulfures impliqués dans le maintien de la structure lasso : les classes I avec deux ponts, les classes II sans pont et les classes III avec un seul pont disulfure (Arnison et al., 2013) (Figure 2.10).

La microcine J25, produite par *E. coli* AY25, est le peptide lasso le plus étudié. Il appartient à la classe II des peptides lassos, la queue C-terminale est bloquée par la présence de deux acides aminés encombrants (Phénylalanine 19 et Tyrosine 20) qui empêchent cette dernière de s'échapper (Arnison et al., 2013). D'un point de vue biologique, les peptides lasso sont en général des inhibiteurs d'enzymes ou des antagonistes de récepteurs, propriétés qui leur confèrent une activité antibactérienne contre des bactéries à Gram positif et négatif. Le spectre d'activité est généralement ciblé aux espèces phylogénétiquement proches de la souche productrice. La microcine J25 est par exemple un inhibiteur de l'ARN polymérase chez les bactéries, la propeptine un inhibiteur d'une endopeptidase ou encore l'anantine un antagoniste du facteur natriurétique auriculaire. Les peptides lasso, tels que les lariatines A et B présentent une activité antimycobactérienne (Arnison et al., 2013).

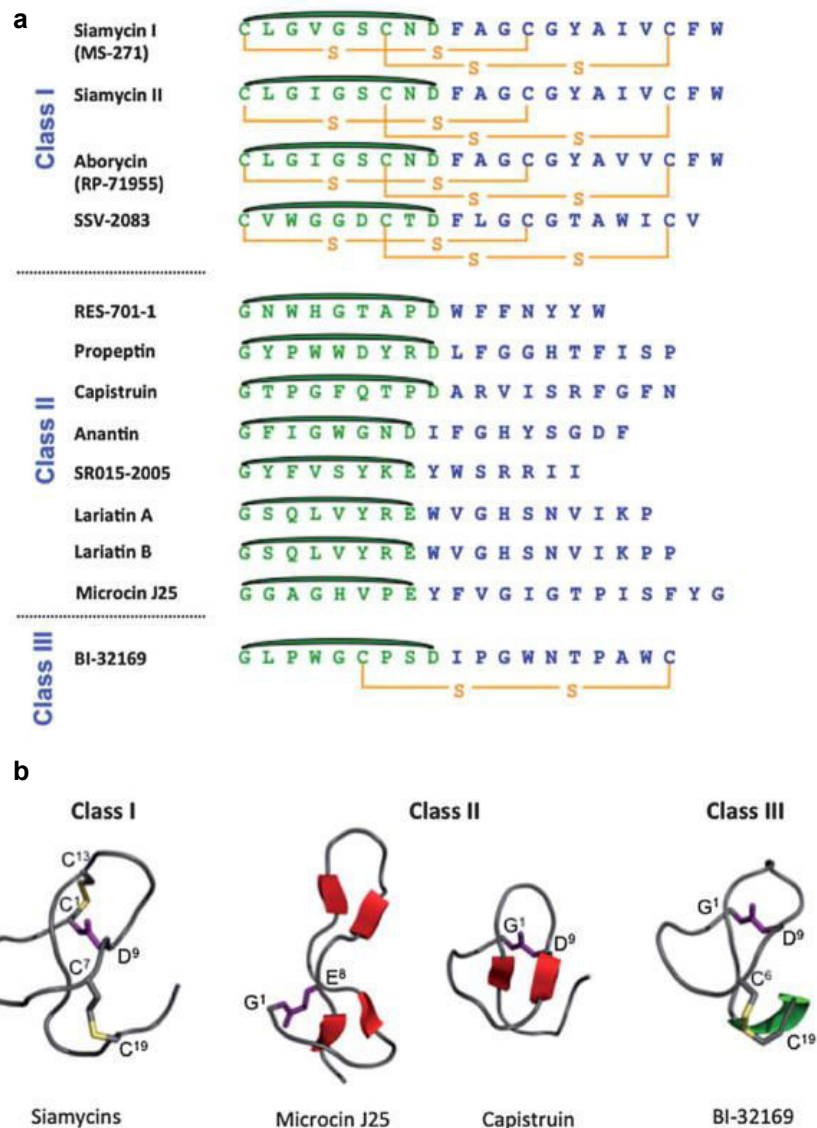


Figure 2.10 : **a** Séquence de peptides lasso, en vert les acides aminés impliqués dans le macrolactame, en bleu les acides aminés impliqués dans la queue C-terminale et en jaune les ponts disulfures. **b** Structure tridimensionnelle des trois classes de lasso peptides (Arnison et al., 2013).

2.3.4 Les thiopeptides

Les thiopeptides ont été détectés pour la première fois dans les années quarante, aujourd'hui plus d'une centaine de ces macromolécules sont connues. Ils sont généralement produits par des actinobactéries et quelques souches de firmicutes. Structuellement, les thiopeptides sont des macrocycles portant des cycles thiazoles avec parfois plusieurs acides aminés déshydratés. La macrocyclisation donne lieu à un hétérocycle azoté pouvant présenter trois états différents d'oxydation : une piperidine, une dehydropiperidine ou une pyridine (Figure 2.11 a). L'état d'oxydation combiné aux positions de substitution de ce cycle permet de

classer les thiopeptides en 5 classes (Figure 2.11 **b**). En plus du macrocycle initial, on peut également trouver un macrocycle supplémentaire, augmentant ainsi la complexité structurale de ces composés, comme par exemple le thiostrepton A et le nosiheptide (Figure 2.11 **a**) (Arnison et al., 2013).

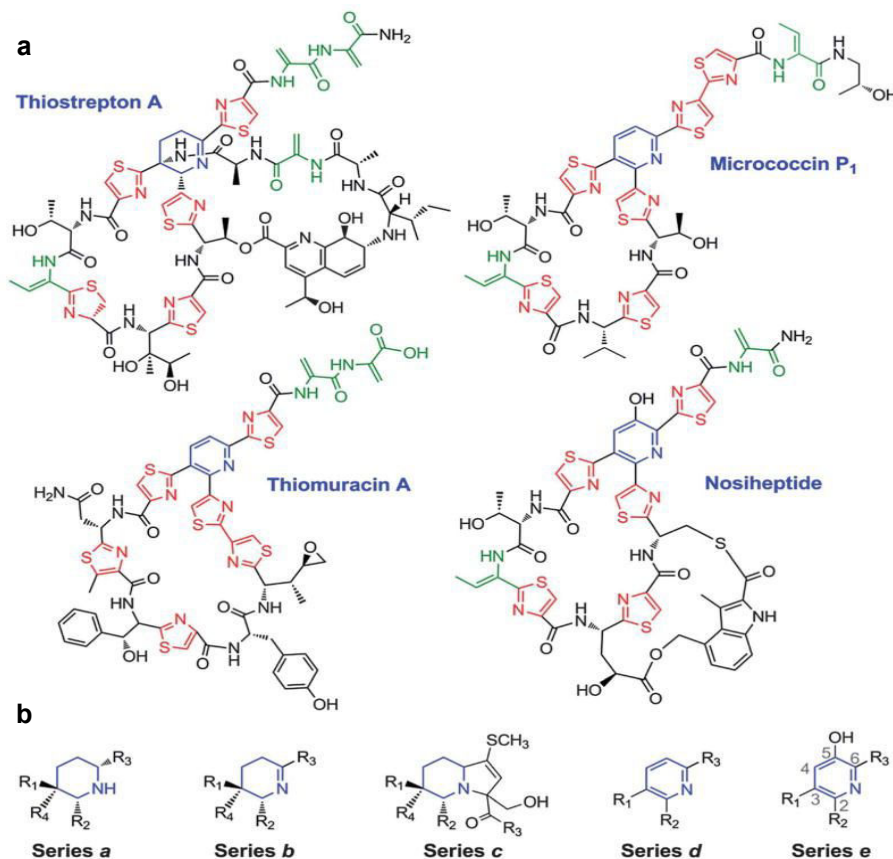


Figure 2.11 : **a** Structure des thiopeptides, en vert les acides aminés déshydratés, en rouge les cycles thiazoles et en vert l'hétérocycle azoté. **b** Classification des thiopeptides (Arnison et al., 2013).

Concernant la biosynthèse, on retrouve dans l'opéron encodant les thiopeptides, différentes enzymes de maturation, identifiées pour d'autres classes de RiPPs. Par exemple, des déshydratases vont introduire les acides aminés déshydratés de façon similaire aux lanthipeptides. Des cyclohydratases et déhydrogénases permettent la mise en place des cycles thiazoles. La formation du cycle azoté résulte d'une cycloaddition de deux dehydroalanine. Cette machinerie complexe, est aussi plus tolérante à la séquence du peptide précurseur, permettant de générer différents thiopeptides (Arnison et al., 2013).

L'activité biologique des thiopeptides, fait partie des plus étudiées parmi les RiPPs. Ces composés ont une activité antibactérienne, généralement dirigée contre des bactéries à Gram positif. Deux modes d'action sont généralement décrits concernant les thiopeptides, les deux impactent la synthèse protéique. Le premier est une interaction avec la sous-unité ribosomale 50S et le second une interaction

avec la sous-unité 23S, entraînant des changements conformationnels bloquant la traduction. En complément du rôle antibactérien, il a été mis en évidence que les thiopeptides pouvaient présenter des effets anticancéreux ou antimalaria. Un défi actuel est de comprendre quelle partie d'un thiopeptide est porteur de l'activité, afin de concevoir de nouvelles molécules bioactives (Arnison et al., 2013).

2.3.5 Le potentiel des peptides antimicrobiens

La bio-ingénierie est l'un des atouts majeurs des RiPPs, nous venons de voir que le système de biosynthèse des thiopeptides était capable de modifier différents peptides précurseurs, permettant ainsi de générer une grande diversité de molécules potentiellement actives, et de trouver des variants cliniquement intéressants. De plus, une maîtrise de la machinerie cellulaire permettrait d'intégrer au sein de ces thiopeptides des acides aminés non canoniques, retrouvés habituellement dans les NRPs (Lin et al., 2017b). De même, nous avons vu que la nisine induit l'apparition de résistances chez certaines souches bactériennes. Il a été montré, sur la nisine A qu'une simple mutation de la serine en proline en position 29 (site de la coupure rendant la nisine inactive) induisait une activité anti-bactérienne vingt fois supérieure contre une souche de *L. lactis* résistante à la nisine (Field et al., 2019). La bio-ingénierie laisse aussi une voie ouverte à la production de RiPPs hybrides. L'idée est d'utiliser une séquence précurseur préalablement définie, avec d'une part les sites de reconnaissance des enzymes, et d'autres part les sites de modifications, afin de produire des RiPPs présentant divers motifs comme par exemple des cycles thiazoles avec des lanthionine et methyl-lanthionine (Figure 2.12). La limite de ce concept est la nécessité de maîtriser les voies de biosynthèses des différentes classes de RiPPs (Hudson and Mitchell, 2018).

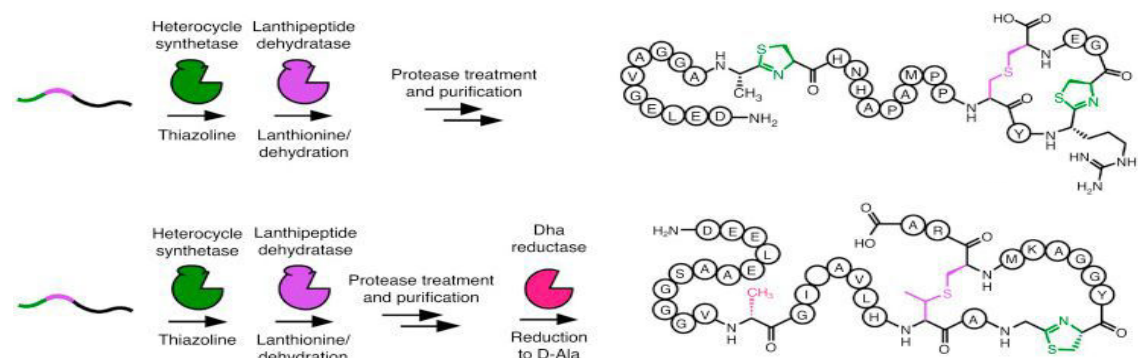


Figure 2.12 : Biosynthèse de RiPPs hybrides par bio-ingénierie (Hudson and Mitchell, 2018).

Nous avons vu que de nombreux RiPPs présentent une activité antibactérienne. A l'instar des phages, une autre piste est l'utilisation des peptides antimicrobiens combinés entre eux ou aux antibiotiques afin d'avoir un pouvoir antibactérien plus important. Les propriétés immunomodulatrices des peptides laissent aussi une possibilité de les utiliser en tant qu'immunostimulant afin d'augmenter la réponse immunitaire naturelle. Les PAMs ont aussi un potentiel

d'agent neutralisant d'endotoxine. Nous avons vu que cette dernière libérée au moment de la lyse bactérienne pouvait entraîner des complications allant jusqu'au choc septique (Gordon et al., 2005).

Nous avons noté avec la nisine, que les PAMs pouvaient aussi avoir d'autres activités biologiques comme des propriétés anticancéreuses. On retrouve dans la littérature de nombreux exemples tels que la laterosporulin, produite par *Brevibacillus* sp. qui a montré une activité anticancéreuse contre différents types cellulaires humains, ou encore la plantaricin A, présentant une activité contre des lymphomes (Karpiński and Adamczak, 2018). Dans un autre domaine, les peptides antimicrobiens ont montré un potentiel antifongique, impactant la formation de biofilms par les champignons au cours de l'infection (Delattin et al., 2017). Par ailleurs, il a été montré une activité insecticide de la protéine PA1b, extraite de la graine du pois, présentant un effet contre le charançon du blé, espèce ayant un impact important sur les cultures céréalières (Gressent et al., 2011).

2.3.6 Les défis d'un développement clinique

A l'instar des vaccins et des phages, les peptides antimicrobiens ont de véritables défis à relever sur le trajet d'un développement clinique. L'une des premières barrières à considérer est directement liée à la nature moléculaire des peptides antimicrobiens. En effet ces derniers sont sujets aux peptidases du système gastro-intestinal, du foie, des reins ou encore du sang (sérum). Ce phénomène va considérablement réduire le temps de demi-vie des peptides, et donc réduire l'accumulation des peptides dans les tissus ce qui sera problématique si une longue durée d'action est recherchée. Pour contrer ce problème, il est possible par exemple d'utiliser des nanosystèmes, qu'ils soient actifs ou passifs pour administrer le peptide, cela permettrait de protéger le peptide et donc d'augmenter l'efficacité sur la cible (Biswaro et al., 2018). Un deuxième défi est que les PAMs n'obéissent pas aux règles de Lipinski, qui prédisent que ces macromolécules n'auront pas une absorption suffisante par voie orale, due à leurs poids moléculaires (Lipinski et al., 2001). Ceci combiné à la faible perméabilité membranaire (Henninot et al., 2018), fait que l'étude pharmacocinétique des peptides antimicrobiens n'est pas complètement comprise, ce qui freine le développement de molécules potentiellement actives (Biswaro et al., 2018). Produire des macromolécules actives, que ce soit par synthèse ou par expression hétérologue est plus compliqué que la production de petites molécules actives. Ces procédés étant plus chronophages, un coût élevé de production des PAMs en découle (Marx, 2005). Combiné à la réticence à l'investissement dans la recherche d'agents anti-infectieux, vue dans le premier chapitre, il est difficile d'amorcer le développement de PAMs en tant que médicaments.

Malgré les barrières énoncées précédemment, de nombreux médicaments peptidiques sont en développement clinique à l'heure actuelle. Si la majorité des peptides développés, le sont dans le domaine de l'oncologie et des maladies métaboliques (par exemple le diabète avec toutes les variantes de l'insuline), il faut relever qu'environ une vingtaine de peptides présentant une activité antimicrobienne est en cours de développement ou approuvée (Figure 2.13) (Henninot et al., 2018).

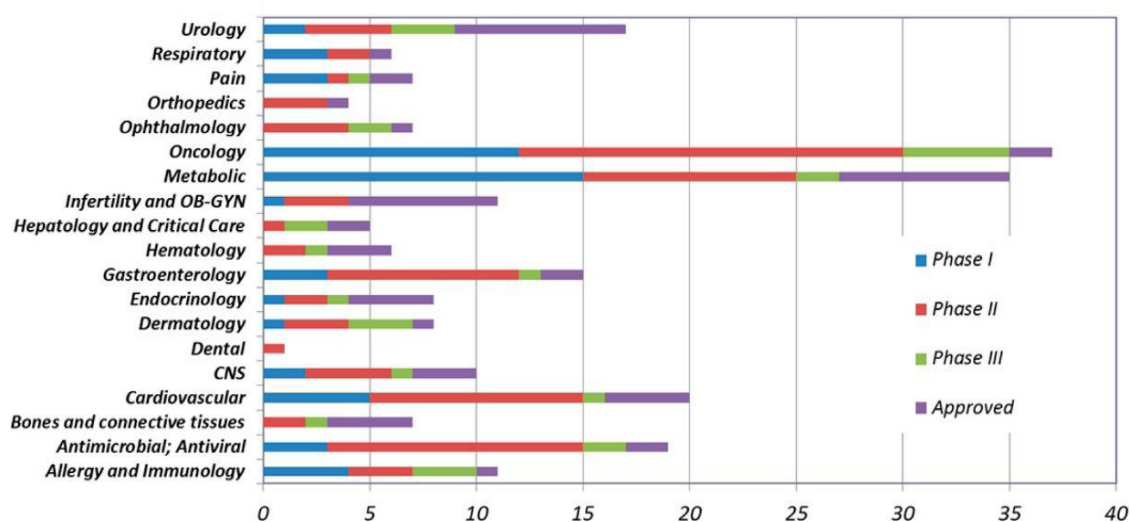


Figure 2.13 : Peptides approuvés ou en développement en pharmacie (Henninot et al., 2018).

2.3.7 Les sources de peptides antimicrobiens

Depuis le début des années deux mille, de par leur fort potentiel, les peptides antimicrobiens ont attiré l'attention, ce qui se traduit par une augmentation importante du nombre de publication par la communauté scientifique (Figure 2.14) (Mahlapuu et al., 2016). Pour promouvoir la recherche sur ces macromolécules, on a vu émerger en France en 2014, un groupe de recherche intitulé « MultiFonction des Peptides AntiMicrobiens » (MuFoPAM) visant à fédérer la communauté française à développer des collaborations inter-laboratoires et à valoriser les recherches sur les peptides antimicrobiens, qu'elles soient théoriques ou techniques.

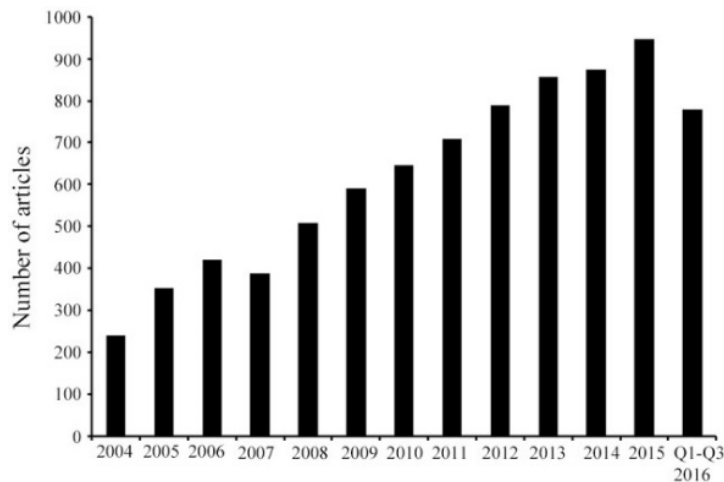


Figure 2.14 : Publications sur les peptides antimicrobiens entre 2004 et septembre 2016 (Mahlapuu et al., 2016).

L'exemple le plus marquant de ces dernières années est la découverte d'un peptide antimicrobien isolé du sang de dragon de Komodo par l'équipe de Monique van Hoek. Ce peptide nommé DRGN-1, a montré un effet contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*, dont certaines souches résistantes sont responsables de la formation de biofilms au niveau de plaies infectées (Chung et al., 2017). Une année auparavant, cette même équipe avait déjà réussi à isoler un peptide du sang d'alligator. Ce dernier présentant une activité contre *A. baumannii* et aucun effet cytotoxique sur cellules humaines (Barksdale et al., 2016). De tels travaux montrent le potentiel des PAMs, et stimulent la communauté scientifique pour découvrir de nouveaux peptides antimicrobiens dans le monde végétal, ou animal. Cependant, comme nous l'avons vu au cours du chapitre 1, la production de peptides antimicrobiens par les bactéries est le moyen de survivre ou de s'imposer dans un écosystème particulier. L'un des milieux les plus étudiés est le microbiote intestinal humain, un écosystème où cohabitent, bactéries, virus, parasites, champignons non pathogènes et cellules eucaryotes. Pour maintenir l'homéostasie de ce milieu les différents acteurs vont produire des molécules antimicrobiennes. Due à la grande diversité de micro-organismes et de cellules eucaryotes, le microbiote intestinal est un système de choix pour la découverte de nouveaux PAMs (Garcia-Gutierrez et al., 2019). L'étude de peptides antimicrobiens sécrétés par *Ruminococcus gnavus*, bactérie présente chez 90 % des individus sains, constitue l'axe de recherche de ce mémoire (Qin et al., 2010).

Chapitre 3 : Les bactériocines de *Ruminococcus gnavus* E1

Depuis plus d'une centaine d'année, la présence de micro-organismes au niveau du tube digestif est connue et de nombreuses hypothèses ont été faites sur la possibilité d'une symbiose entre cette population et l'organisme humain. Cependant, les études de cette interaction étaient limitées techniquement, ne permettant que quelques cultures *in vitro* d'espèces du microbiote. Le séquençage génétique à haut débit a permis de donner un nouvel élan à ce champ d'étude, permettant ainsi de démontrer l'importance du microbiote intestinal. Il représente entre 10^{12} et 10^{14} micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons...) soit environ un poids estimés à 1,5 kilos. La composition du microbiote est unique à chaque individu, se constitue dès la naissance, et évolue au long de notre vie en accord avec notre régime alimentaire, notre hygiène, notre génétique, notre environnement ou encore les traitements thérapeutiques. Les genres bactériens les plus représentés sont les bactéroïdes et les firmicutes.

Le microbiote est essentiel et assure des fonctions vitales qui permettent de le considérer aujourd'hui comme un organe à part entière. Tout d'abord, un rôle dans la digestion en participant par exemple à l'hydrolyse de molécules ou à l'assimilation de nutriments. Des animaux axéniques (sans microbiote) ont des besoins énergétiques supérieurs de 20 à 30 % par rapport à des animaux normaux. Le microbiote intestinal va aussi jouer un rôle direct sur l'épithélium intestinal, il a été observé chez des animaux axéniques une motricité et une vascularisation réduites de ce dernier. Un rôle essentiel est celui de barrière contre les pathogènes exogènes. Par la production de substances antibactériennes, les bactériocines, le microbiote participe activement à la défense immunitaire. De même, il a été observé un déséquilibre du microbiote dans des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), dont la maladie de Crohn, mais aussi dans des maladies neurologiques comme la maladie de Parkinson par exemple. Des études montrent aujourd'hui l'importance du microbiote humain et du tube digestif pour notre corps. Le tube digestif possède son propre système nerveux (système nerveux entérique) directement relié à l'encéphale. Aujourd'hui l'étude de ce « deuxième cerveau » combinée à celle du microbiote est en pleine effervescence afin de comprendre leurs rôles naturels et leurs implications dans certaines pathologies.

Nous allons discuter au cours de ce chapitre du rôle des peptides antimicrobiens au sein du microbiote pour se focaliser ensuite sur les bactériocines produites par *R. gnavus* E1.

3.1 Les peptides antimicrobiens dans l'homéostasie

Préalablement, il est important de distinguer les termes : peptides antimicrobiens, RiPPs et bactériocines. Tous les trois désignent des macromolécules de nature protéique, ils diffèrent selon leurs voies de biosynthèse et leurs tailles (Tableau 3.1). Les bactériocines de *R. gnavus* répondant aux trois termes, ceux s'y seront utilisés indifféremment.

	PAMs	RiPPs	Bactériocines
Taille	< 10 kDa		∅ limite
Synthèse	Voies ribosomale et non ribosomale	Par voie ribosomale uniquement	
Activité	Au moins antimicrobienne	Antimicrobienne, anticancéreuse, allélopathique...	Au moins antibactérienne
Organisme producteur	Tout organisme des 3 domaines du vivant (eucaryotes, procaryotes, archées)		Bactéries uniquement

Tableau 3.1 : Distinction des termes PAMs, RiPPs et bactériocines.

Les interactions entre les cellules intestinales eucaryotes et les bactéries commensales sont essentielles afin de maintenir l'homéostasie et d'éviter un déséquilibre (dysbiose) au sein de la population microbienne. Les peptides antimicrobiens, qu'ils soient eucaryotes ou procaryotes vont jouer un rôle clé dans la défense de l'organisme contre des pathogènes (Sivieri et al., 2017). De par leur action antimicrobienne directe, les PAMs eucaryotes sont la première ligne de défense du système immunitaire. Parmi eux, les défensines et les cathélicidines sont deux groupes de peptides antimicrobiens humains. Les défensines, produites par des neutrophiles et des cellules de Paneth, sont des peptides d'une trentaine d'acides aminés, structurés en triple feuillet β , entraînant la formation de pores chez la cible microbienne (Sivieri et al., 2017). L'expression de ces peptides eucaryotes est finement régulée, évitant ainsi un appauvrissement du microbiote intestinal. La production de PAMs en combinaison avec d'autres acteurs du système immunitaire (cytokines, chemokines...) aboutit à la mise en place d'un système de défense efficace contre les pathogènes. Parallèlement aux eucaryotes, les bactéries ont aussi évolué pour produire des PAMs, en particulier des bactériocines. Ces dernières vont permettre la régulation de certaines populations bactériennes, par exemple la thuricin CD produite par *Bacillus thuringiensis* diminue la population de *C. difficile*. Les bactéries à Gram positif (comme *B. thuringiensis*) produisent des bactériocines

que l'on classe en deux grands groupes, les lanthipeptides et les non lanthipeptides. Les bactéries à Gram négatif produisent deux autres classes de bactériocines selon leurs tailles : les colicines (25-80 kDa) et les microcines (<10 kDa). Les pathogènes, quant à eux, vont aussi produire des PAMs, afin de diminuer certaines populations bactériennes, facilitant ainsi leur implémentation, en prenant leur place au sein du microbiote. Enfin, on peut rajouter à cet écosystème la présence de bactéries probiotiques, elles aussi productrices de PAMs (Chung and Raffatellu, 2019). L'étroite collaboration entre les cellules eucaryotes et le microbiote humain, aboutissant à une production régulée de peptides antimicrobiens, permet la mise en place d'une barrière efficace contre les pathogènes et donc le maintien de l'homéostasie (Figure 3.1) (Sivieri et al., 2017). Aujourd'hui, la caractérisation complète des PAMs du microbiote reste un défi important, que ce soit pour leur structure ou leur rôle au sein du microbiote. La diversité du microbiote en fait un écosystème très intéressant pour la découverte de nouveaux composés de ce type. Dans la suite de ce mémoire, nous allons nous focaliser sur la souche *R. gnavus* E1, bactérie du microbiote intestinal humain et sur la production de bactériocines par ce micro-organisme.

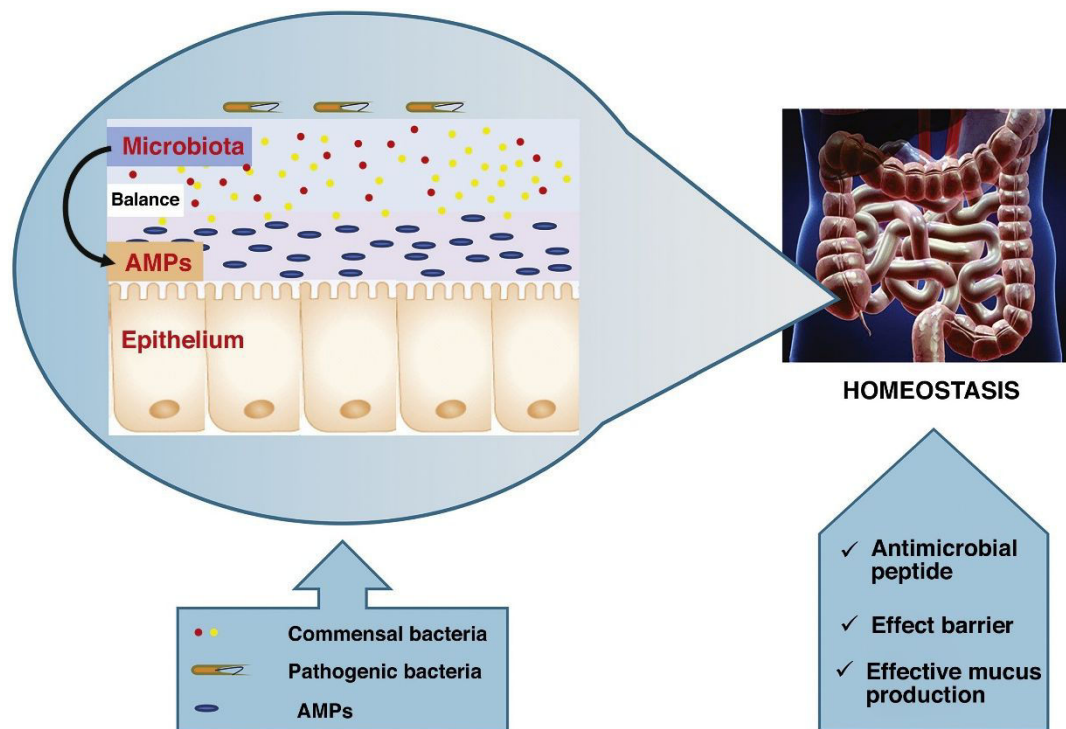


Figure 3.1 : Le microbiote intestinale, barrière microbienne contre les pathogènes (Sivieri et al., 2017).

3.2 *Ruminococcus gnavus* E1

R. gnavus E1, bactérie à Gram positif strictement anaérobie, a été isolée des contenus fécaux d'un homme adulte sain (Ramare et al., 1993). Initialement, chez des rats mono-colonisés par *R. gnavus*, la souche E1 a montré la production d'une substance anti *Clostridium perfringens* sous la dépendance de trypsine (Ramare et

al., 1993). Des cultures *in vitro* de *R. gnavus* E1, en présence de trypsine, ont permis d'isoler et de purifier cette bactériocine, la Ruminococcin A (RumA). La dégradation d'Edman combinée à une analyse en spectrométrie de masse MS/MS a montré que RumA était un lanthipeptide (Dabard et al., 2001). Afin de confirmer que RumA est la substance antibactérienne produite *in vivo* chez les rats mono-colonisés, un protocole de purification à partir des contenus caecaux a été mis en place. Ce dernier a permis d'isoler la bactériocine active contre *C. perfringens*. Cependant, la caractérisation biochimique de cette dernière n'a révélé aucun motif Lan, ou MeLan, caractéristique des lanthipeptides. L'ensemble de ces travaux a mis en évidence que dans ces conditions la souche E1 produisait une autre bactériocine dans ces conditions, la Ruminococcin C (RumC) (Figure 3.2) (Crost et al., 2011). Il est important de noter que l'opéron responsable de la biosynthèse des bactériocines RumC est uniquement présent chez *R. gnavus* E1 au contraire de celui de RumA désimé par *R. gnavus* et des souches proches phylogénétiquement (Marcille et al., 2002).

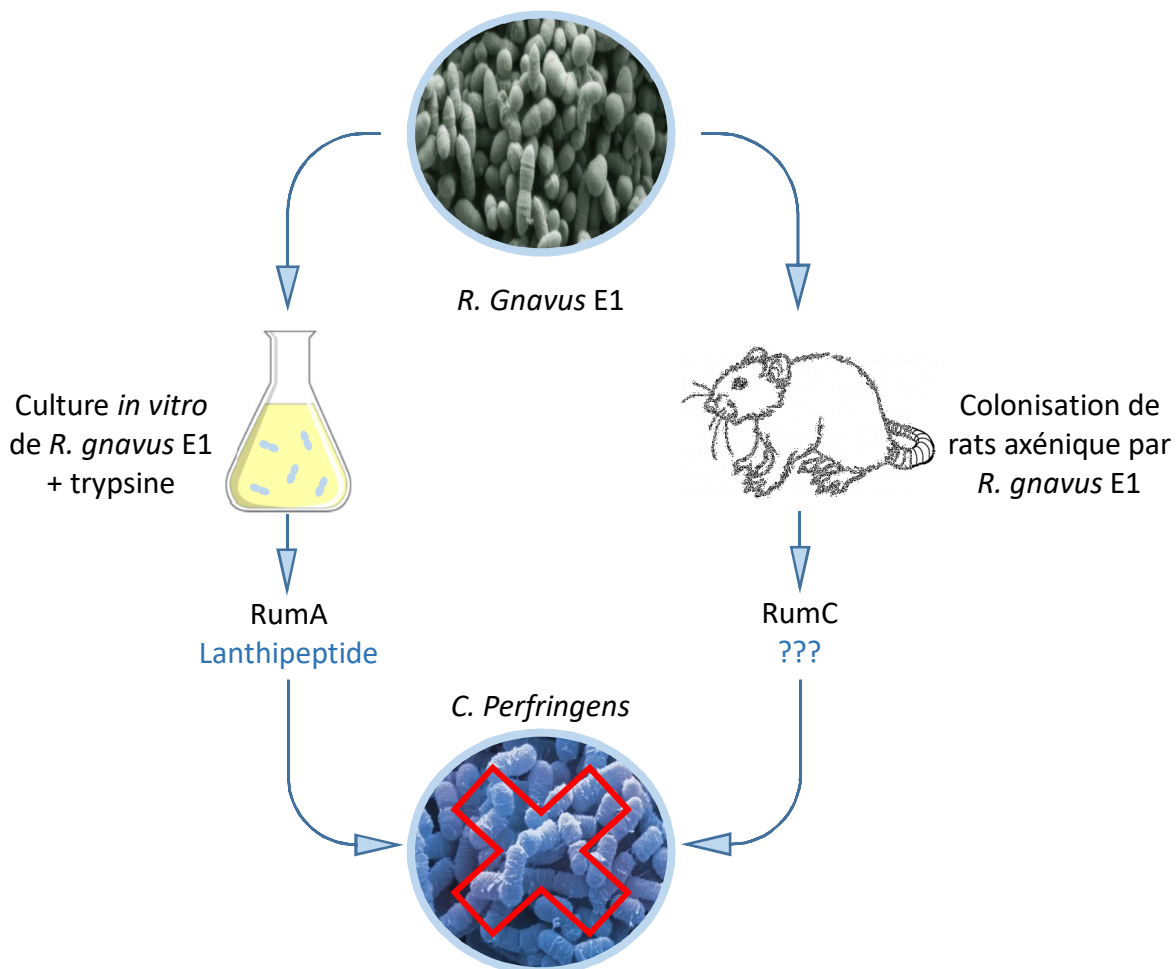


Figure 3.2 : Les bactériocines anti *C. perfringens* de *R. gnavus* E1, les Ruminococcins A et C.

3.3 La Ruminococcin A

Le lanthipeptide RumA a été purifié à partir du surnageant de culture de *R. gnavus* E1, permettant sa caractérisation (Dabard et al., 2001). L'opéron responsable de la biosynthèse de RumA a été identifiée par la suite (Gomez et al., 2002). Ces travaux montrent que des opérons similaires ont été largement disséminés à travers *R. gnavus* et chez des espèces proches phylogénétiquement isolées du microbiote fécal (Marcille et al., 2002). Treize cadres de lecture ouverts ont été identifiés, les gènes *rumFEGHR2*, impliqués hypothétiquement dans l'immunité, les gènes *rumRK*, régulant l'expression de l'opéron, *rumT*, nécessaire aux transports des bactériocines, *rumM*, codant l'enzyme de maturation de RumA et enfin *rumA1A2A3*, codant pour le précurseur de RumA (preRumA) (Figure 3.3 a) (Ongey et al., 2018). Ces trois gènes codent pour un même précurseur de RumA, un peptide de quarante-sept acides aminés dont les vingt-trois premiers correspondent à la séquence du peptide leader. Ils peuvent être le résultat de la multiplication génétique au cours de l'évolution.

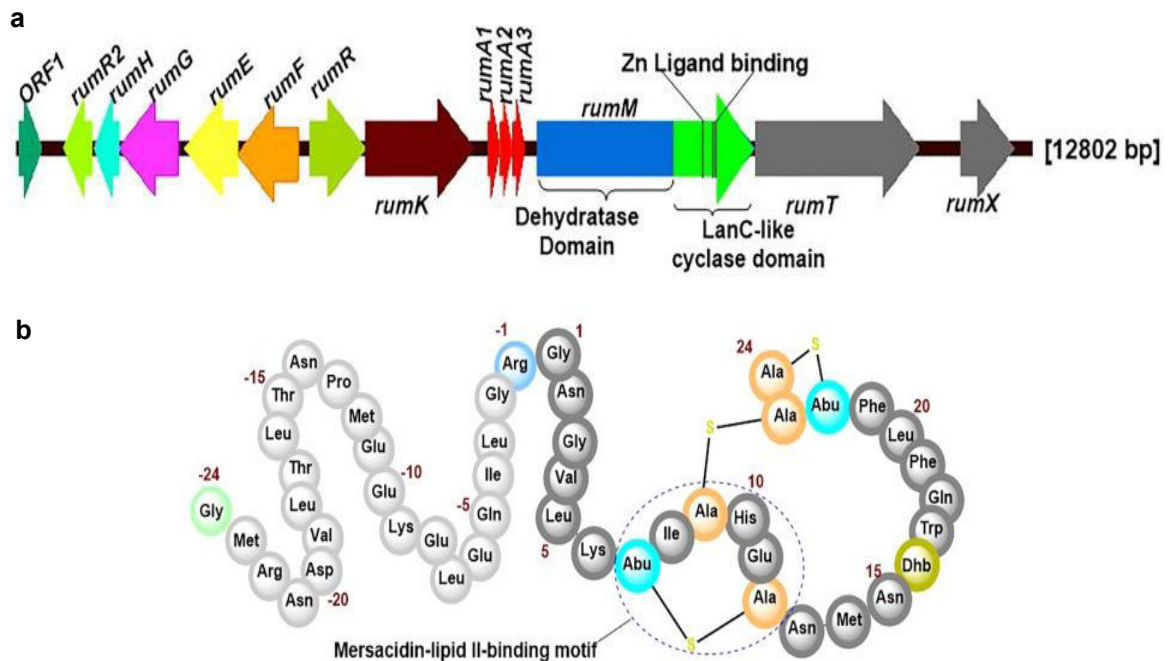


Figure 3.3 : **a** Opéron responsable de la biosynthèse de RumA. Les gènes *rumFEGHR2*, impliqué dans l'immunité, *rumKR*, dans la régulation de l'expression, *rumT*, dans le transport et l'activation de RumA, *rumM*, dans la maturation de preRumA et *rumA1A2A3*, encodant preRumA. **b** Représentation schématique de la structure de preRumA modifié : en blanc le peptide leader et en noir, RumA présentant les motifs Lan et MeLan (adaptée de Ongey et al., 2018).

RumA est un lanthipeptide de classe II, la lanthionine synthase RumM catalyse les deux étapes de formation du motif Lan et des deux motifs MeLan. Le résidu Lan résulte de l'addition de la Cys 23 sur la Ser 9, les résidus MeLan résultent quant à eux de l'addition de la Cys 12 et 24 sur, respectivement, la Thr 7 et 22 (Figure 3.3 b). Il a été proposé que le peptide leader soit impliqué dans la reconnaissance de preRumA par RumM, permettant ainsi sa fixation et la transformation de preRumA. Par ailleurs, la présence du peptide leader empêche le peptide d'être actif. Ce dernier est clivé par RumT le rendant ainsi efficient et est exporté de *R. gnavus*. Concernant le mécanisme de maturation, il a été supposé qu'à l'instar des autres lanthionine synthase de classe II, RumM présente un site actif coordonnant un atome de zinc pouvant coordonner la cystéine et favoriser une addition de Michael sur l'acide aminé partenaire préalablement déshydraté. Un système d'expression hétérologue de RumA chez *E. coli* a été mis au point. Un premier plasmide contenant le gène de RumM nécessaire à la maturation et un deuxième plasmide permettant d'exprimer RumA sous forme de protéine fusion, présentant une étiquette GFP en partie N-terminale qui n'empêche pas l'action de RumM. Ce système de production, permet de produire, après clivage du peptide leader à la trypsine, un à deux mg par litre de culture de RumA actif contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Ongey et al., 2018).

3.4 Les Ruminococcins C

La colonisation de rats axéniques par *R. gnavus* E1 a permis de mettre en évidence des substances anti *C. perfringens*. Il a été montré par RT-qPCR, que l'expression de RumA était très faible dans les contenus caecaux actifs, et que *R. gnavus* E1 était capable de produire d'autres substances actives contre *C. perfringens*, les Ruminococcins C. Une purification à partir des contenus caecaux a permis d'isoler trois fractions actives. Il a été montré que ces dernières avaient un effet synergique contre *C. perfringens* et que cette activité était conservée après un traitement acide ou après chauffage (conservation de l'activité à 75 °C). L'analyse en spectrométrie de masse de ces fractions a permis d'identifier trois bactériocines au sein de ces deux fractions : RumC1, RumC4 et RumC5. De plus, la spectrométrie de masse couplée au séquençage peptidique par la méthode de dégradation d'Edman, à défaut d'avoir la séquence totale (bloquée au onzième acide aminé), indique l'absence de motifs Lan et MeLan, démontrant que les RumC ne sont pas des lanthipeptides. Les gènes impliqués dans la biosynthèse de ces trois bactériocines ont été identifiés : *rumC1*, *rumC4*, *rumC5*. Par séquençage du génome de *R. gnavus* E1 deux autres séquences similaires ont été identifiées : *rumC2* et *rumC3*. Ces cinq gènes partagent une grande similarité de séquence (69-87 %) (Tableau 3.2) encodant les prébactériocines RumC (nRumC) (Croft et al., 2011).

a	<i>rumC2</i>	<i>rumC3</i>	<i>rumC4</i>	<i>rumC5</i>
<i>rumC1</i>	87 (82)	76 (82)	70 (76)	69 (72)
<i>rumC2</i>	100	75 (80)	70 (76)	71 (76)
<i>rumC3</i>		100	78 (82)	83 (84)
<i>rumC4</i>			100	79 (82)

b	RumC2	RumC3	RumC4	RumC5
RumC1	86 (80)	70 (86)	70 (80)	71 (86)
RumC2	100	62 (75)	67 (75)	68 (82)
RumC3		100	71 (80)	84 (86)
RumC4			100	78 (84)

Tableau 3.2: **a** Pourcentage d'identité des gènes *rumc1-5*. **b** Pourcentage d'homologie des bactériocines RumC (adaptée de Crost *et al.*, 2011).

Le régulon responsable la biosynthèse des RumC comprend dix-sept cadres de lecture ouverts sous la dépendance de cinq promoteurs eux même régulé par un système à deux composantes de type Histidine-Kinase (Figure 3.5 **a**) : les gènes *rumR_cK_c*, probablement nécessaires à la régulation, *rumI_c1I_c2E_cY_cF_cG_c*, apparemment impliqués dans l'immunité, *rumT_cP_c*, codant un transporteur et une protéase pour l'export des bactériocines, *rumC1C2C3C4C5*, les nRumC et deux gènes *rumM_c1* et *rumM_c2* présentant 96 % d'homologie de séquence et encodant des enzymes appartenant à la famille des radical-SAM, impliquées dans la modification des prébactériocines. L'expression de ces gènes a été observée, *in vivo*, *in vitro*, et comparée à l'expression de *rumA*. Chez les rats monoxéniques on observe une expression importante des gènes encodant les nRumC comparée au reste du régulon tandis qu'il n'y a pas d'expression *in vitro*. Inversement, *rumA* est exprimée *in vitro* en présence de trypsine (Figure 3.4 **b**). La composition moyenne en base G et C du régulon RumC est de 35 %, similaire à RumA (32 %), mais bien moins élevés que pour le génome de *R. gnavus* E1 (43 %). Cela suppose que ces gènes ont pu être acquis par transfert horizontal de gènes d'une autre bactérie avec un génome moins riche en G et C. Des gènes apparentés à *rumC1* ont ainsi été retrouvés chez une dizaine de souches proches phylogénétiquement de *R. gnavus* ce qui corrèle avec le fait que ce régulon soit porté par un élément génétique mobile, un transposon (Pujol *et al.*, 2011).

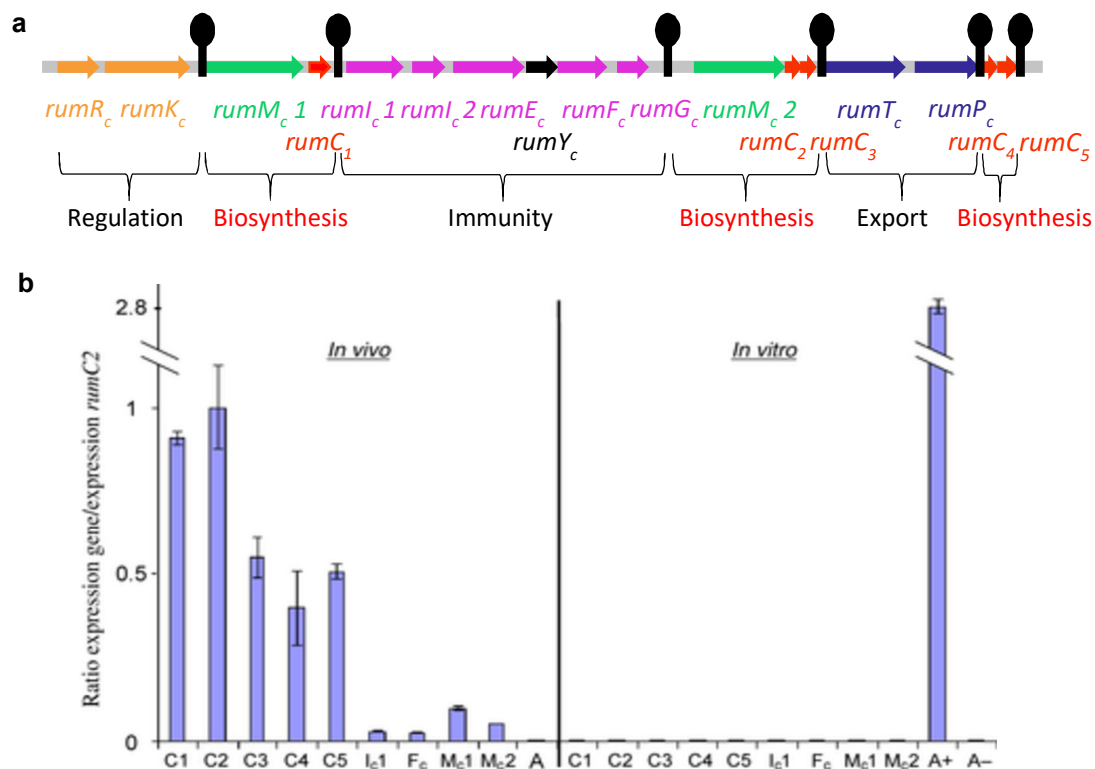


Figure 3.4 : **a** Organisation du régulon RumC. **b** Quantification de l'expression des gènes *rumC* *in vivo* et *in vitro*. Comparaison avec l'expression de *rumA* (A+ : Avec trypsine ; A- : sans trypsine) (adaptée de Pujol *et al.*, 2011).

Les prébactériocines RumC sont constituées de soixante-trois acides aminés. Les dix-neuf premiers résidus côté N-terminal constituent le peptide leader qui est absent lorsque les bactériocines sont purifiées à partir des contenus caecaux. L'analyse par spectrométrie de masse des différentes bactériocines RumC met en évidence une perte de masse de 7 Da par rapport à la masse théorique (Figure 3.5) (Crost *et al.*, 2011). Cette perte de masse associée à la présence d'enzymes radical-SAM ont permis d'avancer l'hypothèse que les peptides RumC appartiennent au groupe des sactipeptides.

	10	20	30	40	50	60	Masse Observée	Masse Théorique
RumC1	MRKI VAGKLQ TGAD FEGSKWGC VCSG STAVAN SHNAGPAYC VGYCGN NGVVTRN ANANVAKTA						4324	4331
RumC2	MRKI VAGKLQ TGAD FEGSKGGCK CSGAVVEN SHNAGPAYC VGYCGN NGVVTRN ANANLARTK					/	4356	
RumC3	MKL VETK TTKTGT NFEGNRAGC ICNGTVAVAN SHNAGPAYC VGYCGN SGGVVTRN ANANVAKTA					/	4242	
RumC4	MRLVQSKRIATGFNFEGSKAGC VCSGTVAVAN SHNAGPAYC VGYCGN NGEVTRN ANANYNIARRS					4456	4463	
RumC5	MKLVT SKTMTGT NFEGNKAGC ICSGSVAVAN SHNAGPAYC VGYCGN NGAVTRN ANANLARTA					4235	4242	

Diagramme illustrant la structure des séquences. Le peptide leader est souligné en bleu sous les premiers résidus (1-19). Le peptide RumC est souligné en noir sous les résidus suivants. Une flèche bleue courbe indique une perte de 7 Da à la fin de la séquence.

Figure 3.5 : Séquences des prébactériocines RumC (adaptée de Crost *et al.*, 2011).

3.5 Les sactipeptides

Les sactipeptides sont des RiPPs présentant des ponts thioéther particuliers entre l'atome de soufre d'une cystéine et le carbone α d'un acide aminé partenaire. Il est important de les différencier des lanthipeptides qui présentent des ponts thioéther liants le carbone β d'une sérine ou d'une thréonine. Dans le cas des sactipeptides, le pont thioéther est introduit par une enzyme radical-SAM par le biais d'un mécanisme radicalaire en une étape au contraire du mécanisme de formation en deux étapes des lanthionines et méthylsionines des lanthipeptides (Figure 3.6).

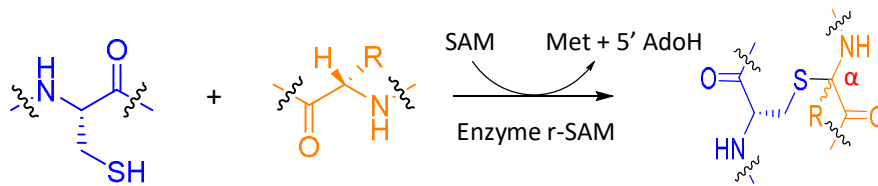


Figure 3.6 : Formation d'un pont thioéther d'un sactipeptide.

A ce jour, sept sactipeptides ont été identifiés, incluant la subtilosin A (*sbo A*), sactipeptide le plus étudié, le *sporulation killing factor* (*Skf*), la thurincin H, la thuricin CD a deux composants (*Trn- α* et *Trn- β*), *Tte1186a* et *Ctea* (Bruender et al., 2016; Grove et al., 2017; Kawulka et al., 2003, 2004; Lee et al., 2009; Liu et al., 2010; Rea et al., 2010). Ces différents RiPPs, présentent dans l'opéron responsable de la biosynthèse, des gènes encodant des protéines nécessaires à la régulation, l'export, l'immunité et un gène encodant une enzyme radical-SAM impliquée dans la maturation de la prébactériocine (Figure 3.7 a). Ils présentent un nombre de ponts thioéther différent compris entre un et quatre. Il est important de noter que les cystéines impliquées dans ces ponts se trouvent dans la partie N-terminale du peptide et les partenaires dans la partie C-terminale, conférant une structure en épingle à cheveux aux sactipeptides connus (Figure 3.7 b,c). De plus, il a été observé une grande diversité dans le partenaire ponté par la cystéine, contrairement aux lanthipeptides où seul une sérine ou une thréonine est impliquée (Himes et al., 2016). Par exemple, la subtilosin A présente trois ponts thioéther entre les cystéines 4, 7 et 13 avec les résidus phénylalanine 31, thréonine 28 et phénylalanine 22, respectivement. A noter qu'en plus de ces trois ponts, la subtilosin A présente une cyclisation N-ter-C-ter (Figure 3.7 b) (Kawulka et al., 2003, 2004). Au cours de ce mémoire, les analyses structurales concernant les sactipeptides seront développées.

Majoritairement les sactipeptides sont produits par des bactéries à Gram positif, *B. subtilis* pour *sboA* et *Skf*, *B. thuringiensis* pour la thurincin H et la thuricin CD et *Clostridium thermocellum* pour *Ctea*. Seul *Tte1186a* est produit par *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *Tengcongensis* MB4, bactérie à Gram négatif. Concernant l'activité antimicrobienne, les études menées sur *sboA* et la thuricin CD ont montré que ces sactipeptides pouvaient interagir avec la membrane cellulaire, entraînant une dépolarisation et une perturbation structurale de cette dernière induisant par la suite des dommages cellulaires entraînant la mort cellulaire (Mathur

et al., 2017; Thennarasu et al., 2005). Concernant le spectre d'activité, une étude a été faite sur la subtilosin A, montrant qu'en plus d'une activité anti *L. monocytogenes*, ce peptide était actif contre d'autres bactéries à Gram positif (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*) mais aussi contre des bactéries à Gram négatif (*Enterobacter aerogenes*, *Porphyromonas gingivalis*) (Shelburne et al., 2007).

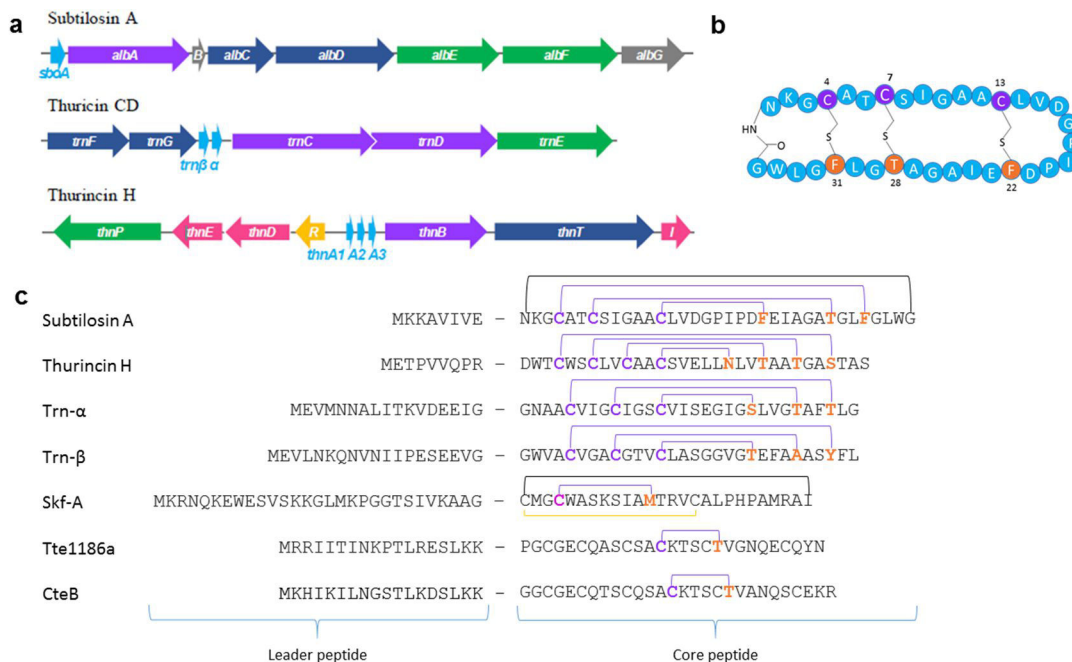


Figure 3.7 : a Opérons de la subtilosin A, la thuricin CD et la Thurincin H, en bleu foncé, les systèmes de transports, en vert, les peptidases, en rose, les protéines impliquées dans l'immunité, en jaune, les protéines de régulations, en gris, les gènes de fonctions inconnues, en violet, les enzymes radical-SAM et en bleu les précurseurs peptidiques. b Modèle schématique de la subtilosin A. c Réseau des ponts thioéther des sactipeptides connus (adaptée de Chiumento *et al.*, 2019).

3.5.1 Les ranthipeptides

Les peptides CteB et Tte1186a sont des peptides SCIFF présentant six cystéines au sein d'une séquence de quarante-cinq acides aminés (SCIFF pour *six cysteines in forty-five residues*). En fin de rédaction de ce mémoire, les travaux de Mitchell sur ce type de peptide mettent en évidence que ces peptides présentent un pont thioéther entre l'atome de soufre d'une cystéine et le carbone β ou γ de l'acide aminé partenaire, définissant ainsi une nouvelle famille de RiPPs, les ranthipeptides. CteB et Tte1186a ne sont donc plus aujourd'hui considérés comme des sactipeptides. Cependant les enzymes intervenant dans la biosynthèse de ces peptides sont des enzymes radical-SAM et les études concernant leurs structures seront discutées par la suite (Hudson et al., 2019).

3.6 Les enzymes radical-SAM

Les enzymes radical S-adenosylmethionine (radical-SAM) sont des enzymes catalysant des réactions radicalaires en biologie. Les membres de cette super famille d'enzymes présentent, dans la majorité des cas, un motif caractéristique particulier, la séquence CX₃CXϕC. Quelques exceptions à ce motifs ont été identifiées, par exemple le motif CX₁₄CXϕC de QueE impliquée dans la biosynthèse de la queuosine (Dowling et al., 2014) ou encore le motif CX₅CX₂C de HmdB impliquée dans la maturation de l'hydrogénase à fer mononucléaire (McGlynn et al., 2010). Les trois cystéines coordinent trois atomes de fer d'un centre[4Fe-4S]²⁺, site actif de l'enzyme (Figure 3.8 a). Le quatrième atome de fer est quant à lui capable de coordonner la S-adenosylmethionine (SAM) (Figure 3.8 b) (Broderick et al., 2014).

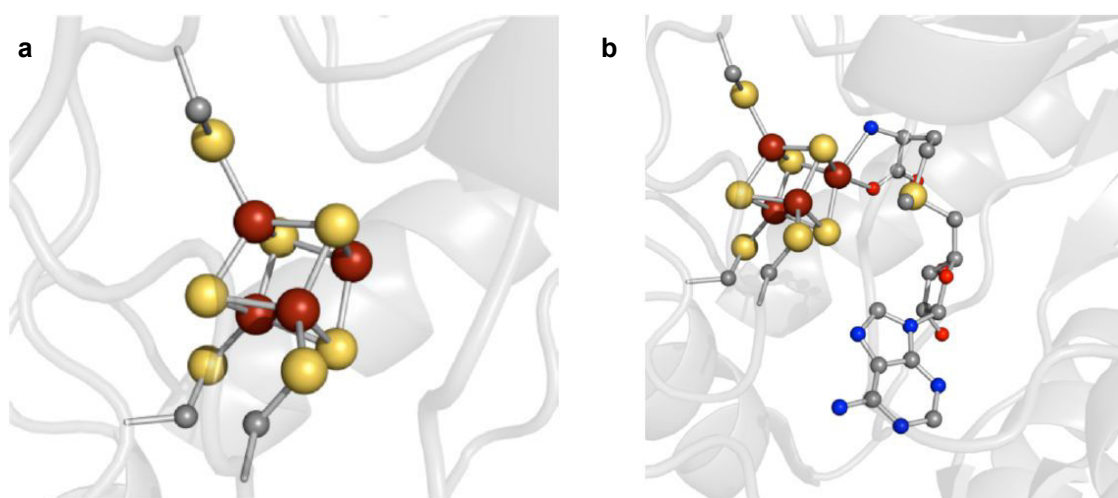


Figure 3.8 : **a** Centre [4Fe-4S]²⁺, coordonné par le motif CX₃CXϕC, caractéristique des enzymes radical-SAM. **b** Coordination de la SAM par son groupement C-amino-carboxylate sur le quatrième atome de fer (Broderick et al., 2014).

En milieu réducteur le centre [4Fe-4S]¹⁺ catalyse la réaction de réductolyse de la SAM en provoquant la rupture homolytique de la liaison S-C(5') conduisant à la formation de la méthionine d'une part, et du radical 5'-désoxyadénosyle (Ado•) d'autre part (Figure 3.9). Ici le transfert d'un électron à la SAM conduit à deux oxydants (Ado• et [4Fe-4S]²⁺) au contraire d'une réaction redox classique, conduisant à une espèce réduite et son partenaire oxydé. La production de Ado• est le mécanisme des enzymes radical-SAM. Cependant, il est important de noter que la SAM présente trois liaisons C-S, et que le clivage de chacune d'elle est possible théoriquement. Bien avant d'avoir identifié la SAM comme précurseur d'Ado•, ce cofacteur était connu comme agent méthylant de la cellule. En effet, toutes les méthyltransférases exploitent le caractère électrophile du sulfonium afin de transférer un méthyl par un mécanisme nucléophile (S_N2) (Fontecave et al., 2004). Parmi les méthyltransférases à domaine radical-SAM, on retrouve celle de classe A présentant une cystéine conservée au sein du site actif et celle de classe B présentant un cofacteur cobalamine impliqué dans le processus de méthylation (Broderick et al., 2014). Le clivage hétérolytique de la liaison S-C(γ) a été observé uniquement chez

Dph2, isolée de *Pyrococcus horikoshii*, impliquée dans la biosynthèse de la diphtamide et la glycérol déshydratase B12 indépendante, enzyme radical-SAM nécessaire à l'activation d'une déshydratase (Figure 3.9) (Demick and Lanzilotta, 2011; Zhang et al., 2010).

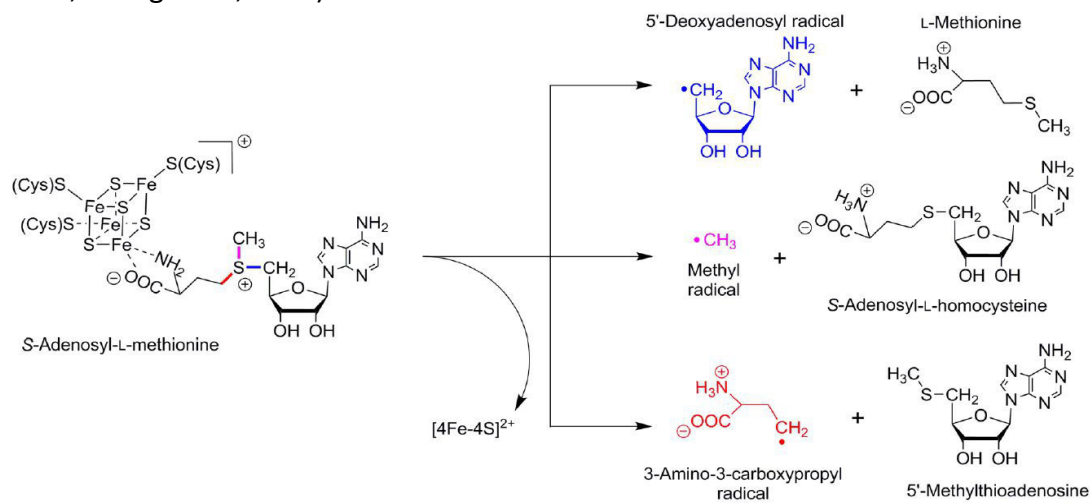


Figure 3.9 : Clivage régiosélectif proposé de la liaison S-C de la SAM. En bleu la liaison S-C(5'), en rose la liaison S-C(methyl) et en rouge la liaison S-C(γ) (Broderick et al., 2014). Le clivage des liaisons S-C(5') et S-C(γ) a été démontré, mais la formation de méthyl radicalaire par coupure de la liaison S-C(methyl) n'a jamais été observée.

Les enzymes radical-SAM sont impliquées dans un grand nombre de processus biologiques où elles ont un rôle critique. On les retrouve dans des voies de biosynthèse de molécules antibactériennes, la synthèse de cofacteurs protéiques, la modification post-traductionnelle de protéines ou encore de la synthèse de ligands non protéiques essentiels à la chimiosélectivité de complexes métalliques. Aujourd'hui la liste des enzymes radical-SAM continue de s'allonger (50 000 membres) (Broderick et al., 2014).

3.7 Les radical-SAM et la biosynthèse de RiPPs

Les enzymes radical-SAM catalysant une grande diversité de réactions, nous nous limiterons ici à celles impliquées dans la biosynthèse des RiPPs. Nous pouvons classer en six grandes catégories les modifications chimiques insérées par ces enzymes : les C-méthylations, les ponts thioéther (C α -S), les ponts C-C, des épimérisations, des décarboxylations suivies de la formation d'un pont C-C. La formation de ponts thioéther étant l'une des parties majeures de ce mémoire, je développerai plus tard les mécanismes de formation proposés à ce jour (Mahanta et al., 2017).

3.7.1 Les C-méthylations

Nous avons vu que la SAM est un agent méthylant majeur dans la cellule, utilisé par les méthyltransférases par un mécanisme nucléophile. D'autres

mécanismes de C-méthylations catalysées par des enzymes radical-SAM ont été mis en évidence. Afin de développer ce point, prenons l'exemple du thiopeptide produit par *Streptomyces actuosus*, le nosiheptide. L'enzyme NosN impliquée dans sa biosynthèse catalyse la méthylation d'un noyau indole en position C4, nécessaire à la formation du second macrocycle du thiopeptide (Figure 3.10 a) (Mahanta et al., 2017).

Le mécanisme proposé pour cette méthylation met en jeu deux molécules de SAM. Dans un premier temps NosN catalyse le clivage réducteur de la SAM générant ainsi le radical Ado•. Ce radical va venir arracher l'atome d'hydrogène sur le méthyl de la deuxième molécule de SAM préalablement clivée au niveau de la liaison S-C(γ), générant ainsi un radical thioadenosyl S-méthylène. Ce dernier va par la suite attaquer le C4 d'un noyau indole, produisant un intermédiaire radicalaire qui après l'élimination du thioadenosine aboutira à la méthylation du carbone en position 4 du noyau indole (Figure 3.10 b) (Mahanta et al., 2017).

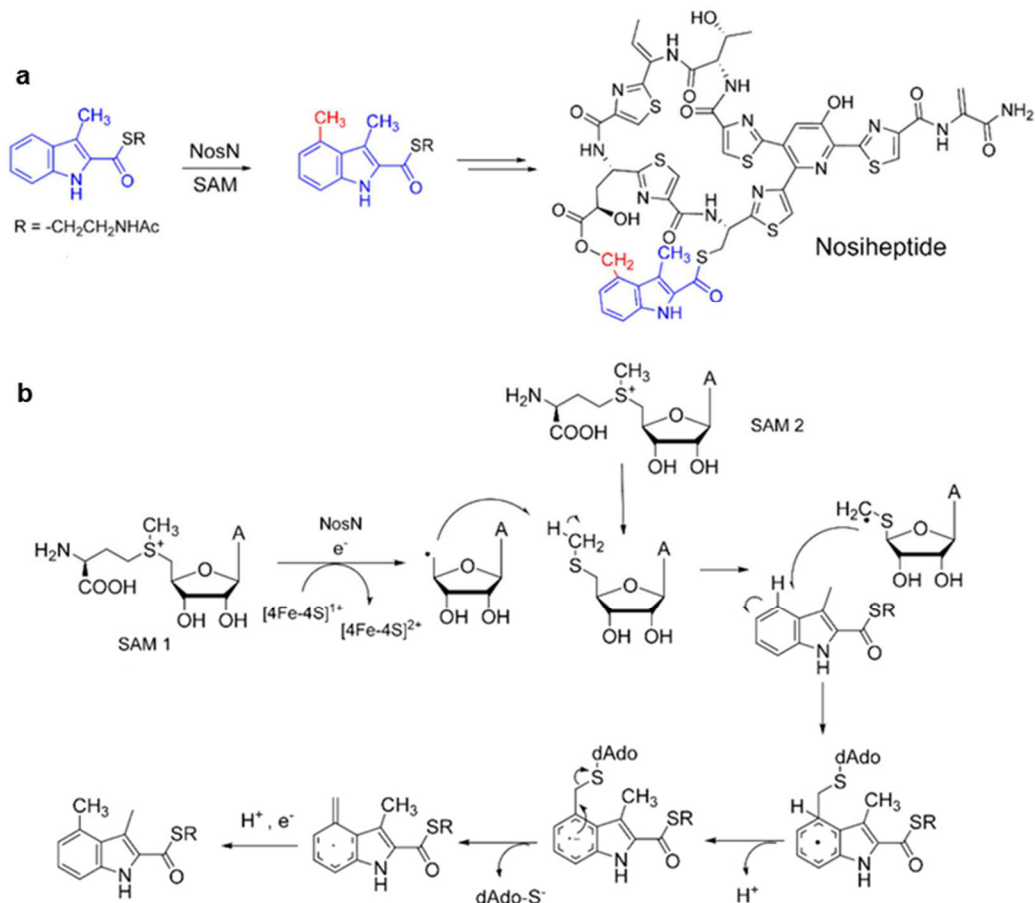


Figure 3.10 : a Méthylation en C4 de l'indole par NosN. b Mécanisme proposé de la méthylation (Mahanta et al., 2017).

3.7.2 Les ponts C-C

Le streptide est un peptide cyclique produit par *Streptococcus thermophilus* présentant une liaison carbone-carbone entre une lysine et un tryptophane. Il a été proposé que la formation de ce pont résulte de l'action de l'enzyme StrB (Figure 3.11 a). Cette enzyme radical-SAM, va générer le radical Ado• qui vient arracher un atome d'hydrogène sur le carbone β de la lysine. Ce radical va venir réagir avec le noyau indole du tryptophane, qui après déprotonation va aboutir à la liaison C-C (Figure 3.11 b) (Mahanta et al., 2017).

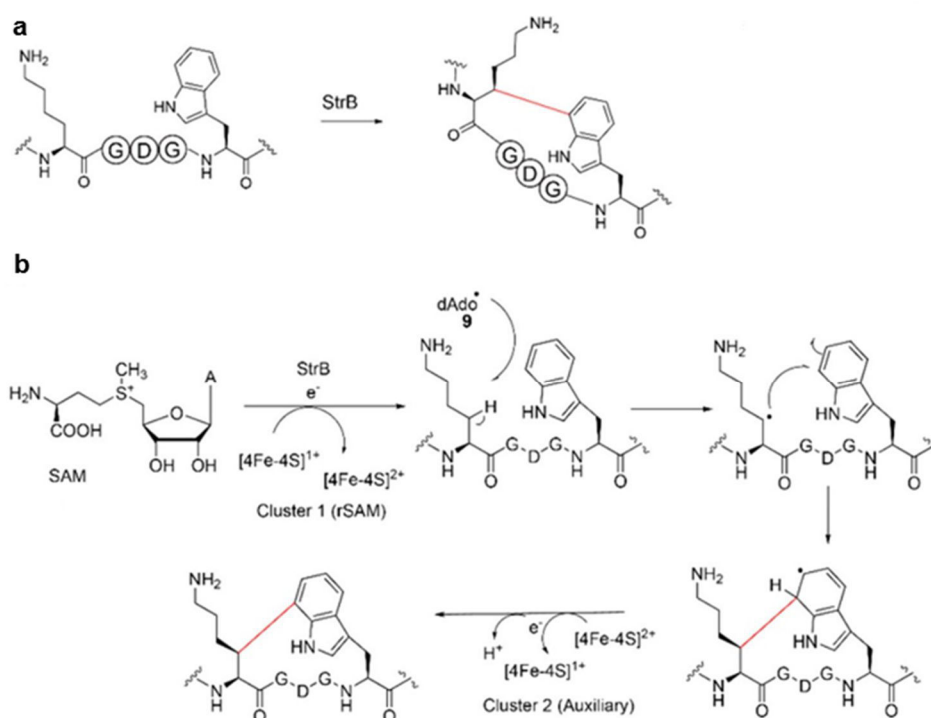


Figure 3.11 : **a** Liaison C-C introduite par StrB sur le streptide. **b** Mécanisme proposé (Mahanta et al., 2017).

3.7.3 Les épimérisations

Les enzymes radical-SAM épimérasés sont responsables de l'introduction d'acides aminés de la série D chez les RiPPs. Prenons l'exemple de la biosynthèse d'un epipetide par YydG. Cette classe de peptide produit par *B. subtilis*, présente uniquement des épimérisations comme modifications post-traductionnelles, en position Val36 ou Ile44 (Figure 3.12 a). Dans le mécanisme proposé, le radical Ado• généré par YydG va arracher un atome d'hydrogène sur la Val36/Ile44, faisant ainsi perdre sa stéréochimie à l'acide aminé. Une cystéine de l'enzyme va réagir avec ce nouveau carbone radicalaire, aboutissant à l'inversion de configuration de l'acide aminé (Figure 3.12 b) (Mahanta et al., 2017).

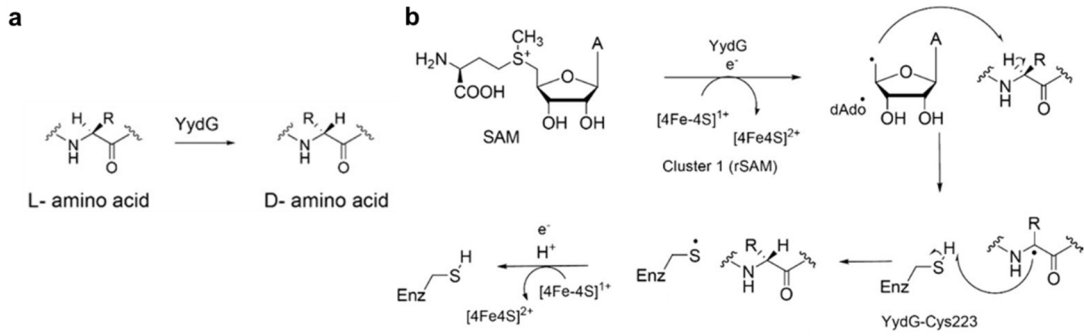


Figure 3.12 : **a** Inversion de configuration introduite par YydG. **b** Mécanisme proposé (Mahanta et al., 2017).

3.7.4 Les décarboxylations suivies d'une liaison C-C

La mycofactine produite par les mycobactéries présente une liaison carbone-carbone, due à l'action de MftC, entre le carbone β d'une valine et le carbone α ou β d'une tyrosine décarboxylée (Figure 3.13 **a**). Dans le mécanisme proposé, la génération d'un premier radical Ado• entraîne la décarboxylation en position α . Un second radical Ado•, aussi généré par MftC, va arracher l'atome d'hydrogène sur le carbone β de la valine, générant ainsi un carbone radicalaire. Ce dernier va réagir avec la double liaison préalablement formée, qui après déprotonation aboutit à l'intermédiaire de la mycofactine (Figure 3.13 **b**). Ce dernier sera pris en charge par d'autres systèmes enzymatiques pour compléter la biosynthèse de la mycofactine (Mahanta et al., 2017).

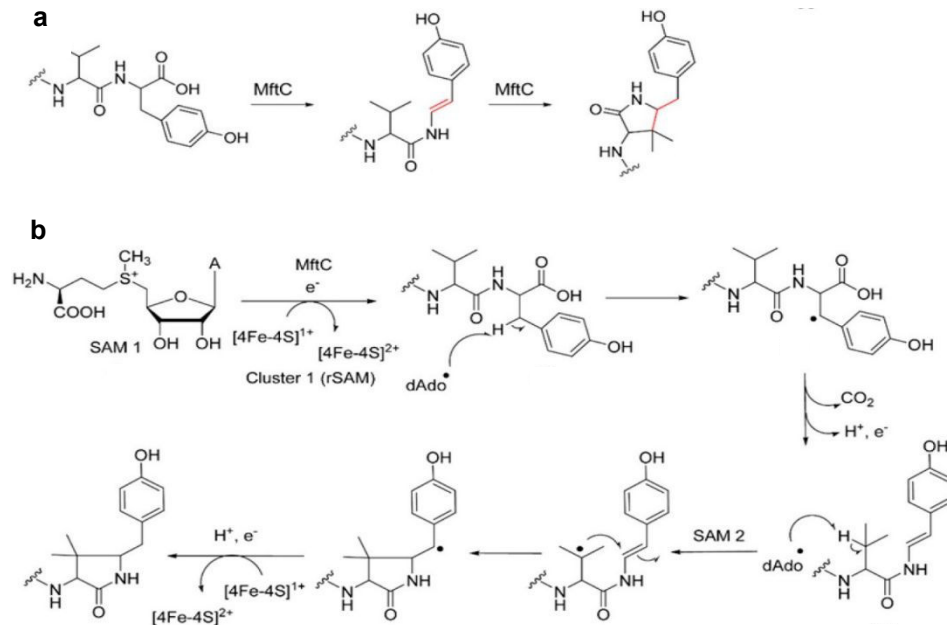


Figure 3.13 : **a** Décarboxylation et cyclisation catalysée par MftC. **b** Mécanisme proposé (Mahanta et al., 2017).

3.7.5 Réarrangements

Nous avons vu précédemment le rôle de l'enzyme radical-SAM NosN dans la méthylation du noyau indole du nosiheptide. Cependant, en amont de cette réaction, une autre enzyme radical-SAM, NosL, est impliquée dans la formation de ce noyau indol par réarrangement d'un tryptophane. NosL catalyse la migration du groupement carboxylate du tryptophane en position C2, avec libération d'ammoniac et de formaldéhyde (Figure 3.14 a). Deux mécanismes ont été proposés pour ce réarrangement. Lors de la première étape identique pour les deux mécanismes, le radical Ado•, généré par NosL, arrache un atome d'hydrogène sur la fonction amine du tryptophane. L'état radicalaire de cette dernière va soit déclencher un départ du groupe amino-carboxylate en position C2, entraînant la formation du noyau indole par élimination d'un radical imine (Figure 3.14 b) soit dans un premier temps entrainer la migration du groupement carboxylate uniquement, suivi de l'élimination de la fonction amine dans un deuxième temps (Figure 3.15 c).

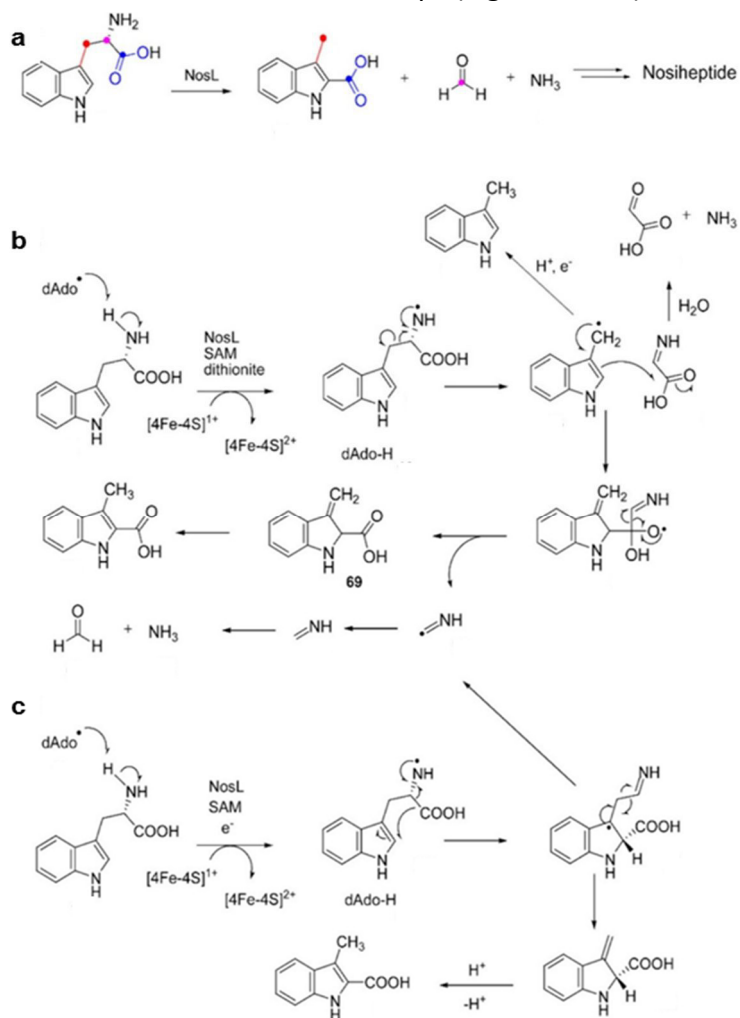


Figure 3.14 : a Réarrangement moléculaire du noyau indole catalysé par NosL. b,c Mécanismes proposés pour la formation du noyau indole (Mahanta et al., 2017).

Les enzymes radical-SAM catalysent au sein des RiPPs de nombreuses modifications chimiques différentes. Ces modifications post-traductionnelles sont toutes initiées par le clivage de la liaison S-C(5'), libérant le radical Ado•. Ce radical hautement réactif va par l'abstraction d'un atome d'hydrogène sur la cible moléculaire, déclencher des réactions chimio- et stéréosélectives. L'identification d'enzymes radical-SAM combinée au potentiel de bio-ingénierie des RiPPs pourrait générer de nouveaux peptides antimicrobiens, exhibant une meilleure activité antibactérienne ou des propriétés pharmacologiques améliorées (Mahanta et al., 2017).

3.8 Contexte et objectifs de la thèse

Les travaux présentés dans ce mémoire s'inscrivent dans le projet RUMBA, soutenu par l'ANR depuis 2016, visant à caractériser et à valoriser les bactériocines RumC. Dans ce but, le projet regroupe différentes équipes aux expertises complémentaires, permettant ainsi une étude complète des bactériocines RumC, en allant de la biosynthèse à l'évaluation de leur activité antimicrobienne *in vitro* et *in vivo*. Le Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux (LCBM), où la thèse a été effectuée au sein de l'équipe BIOCAT, présente une expertise dans l'étude et la caractérisation des enzymes radical-SAM. Comme nous l'avons vu précédemment, deux protéines de la famille radical-SAM sont impliquées dans l'étape de modification post-traductionnelle des peptides RumC. L'équipe Biosciences de l'Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (ISM2) est experte dans l'étude du microbiote intestinal et en particulier dans la détection de nouvelles bactériocines, l'évaluation de leur activité biologique et le mode d'action de ces composés. La plateforme de spectrométrie de masse EDyP de l'Institut de Recherche Interdisciplinaire de Grenoble (IRIG) et la plateforme RMN de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM, Marseille) participent respectivement aux études biochimiques et structurales des peptides RumC. Enfin le dernier partenaire, la société ADISSEO, spécialiste en nutrition animale située à Commeny, est impliquée dans la valorisation du projet.

Nos collaborateurs de l'ISM2 ont développé un protocole de purification des bactériocines RumC, à partir des contenus caecaux de rats colonisés par *R. gnavus* E1. Isoler ces composés à partir d'un milieu biologique complexe était une étape cruciale dans le déroulement du projet. Elle a permis l'analyse en spectrométrie de masse des bactériocines RumC natives produites par *R. gnavus* E1 et a donné « l'empreinte » des modifications chimiques présentes dans les peptides. L'inconvénient de cette voie dite « *in vivo* » d'obtention des bactériocines RumC est son rendement global peu élevé. Dans le but de caractériser les peptides RumC au niveau biochimique, fonctionnel et structural, nous avons donc mis au point un système d'expression et de maturation hétérologue chez *E. coli* pour obtenir ces composés avec de bons rendements.

Nous avons focalisé notre projet sur le peptide RumC1 et sur son enzyme de maturation RumMc1. La caractérisation biochimique et fonctionnelle de cette enzyme sera décrite dans le chapitre 4 avec notamment la reconstitution et l'étude physico-chimique des centres métalliques de RumMc1. Le rôle potentiel des deux centres [Fe-S] additionnels sera également abordé dans cette partie. Le chapitre 5 sera consacré à la production et la maturation hétérologues et à la purification du peptide RumC1. Un accent sera mis sur la caractérisation complète de ce peptide par spectrométrie de masse qui nous a permis de proposer une structure originale pour la forme maturée de ce peptide. Enfin nous présenterons dans le chapitre 6 de ce mémoire l'activité antimicrobienne de RumC1 sur différents pathogènes en discutant notamment du clivage de la séquence leader et du rôle de cette séquence dans l'activité de RumC1. Nous présenterons également les premiers résultats que nous avons obtenus sur le mode d'action du peptide RumC1. Les travaux et les données que nous décrivons dans ce chapitre sont le fruit d'une collaboration étroite avec nos collègues de l'ISM2 à l'Université Aix-Marseille.

Les différentes méthodes expérimentales utilisées au cours de ces travaux seront détaillées dans le chapitre 7.

Chapitre 4 : Caractérisation de l'enzyme radical-SAM RumMc1

Nous avons vu au cours du chapitre précédent que les enzymes radical-SAM étaient impliquées dans un grand nombre de processus biologiques cruciaux en catalysant des réactions radicalaires complexes. La majorité des enzymes radical-SAM arbore un centre [4Fe-4S] coordonné par la séquence conservée, CX₃CX₂C. Le dernier fer, non coordonné par les cystéines, permet la coordination de la SAM et favorise son clivage pour générer le radical Ado• (et une méthionine) et initier la réaction enzymatique.

Concernant les enzymes radical-SAM impliquées dans la modification de peptides produits par voie ribosomale, la littérature indique qu'en plus de ce premier centre fer-soufre, elles possèdent des centres fer-soufre additionnels dans leur partie C-terminale. La conservation de cystéines au sein de ce domaine permet en effet la coordination d'un ou deux centres supplémentaires, essentiels à l'activité de ces enzymes. Suivant le nombre de centres fer-soufre ces domaines sont notés Twitch (un centre) ou SPASM (deux centres).

Les enzymes de maturation RumMc1 et RumMc2 présentent des cystéines, conservées à l'extrémité C-terminale, permettant la coordination de centres fer-soufre additionnels. Au cours de ce chapitre, nous développerons la littérature des enzymes radical-SAM à domaine SPASM et Twitch. Nous présenterons ensuite deux modes de reconstitution de l'enzyme RumMc1 et aborderons sa caractérisation spectroscopique. Enfin nous discuterons du rôle potentiel des centres additionnels dans l'étape de maturation des peptides RumC.

4.1 Les enzymes radical-SAM à domaine SPASM et Twitch

La résolution de structures tridimensionnelles d'enzymes radical-SAM a mis en évidence le domaine radical-SAM, permettant le clivage de la SAM et d'initier le processus radicalaire. Il présente généralement une topologie complète ou partielle $(\beta/\alpha)_6$ d'un tonneau TIM (*triose-phosphate isomerase*), alternant 6 hélices α et 6 feuillets β . Le résultat de cette conservation structurale au sein des enzymes radical-SAM fait que le positionnement de la SAM dans le domaine est pratiquement le même, malgré les interactions spécifiques dues aux différences des chaînes polypeptidiques (Vey and Drennan, 2011) (Figure 4.1). Cette observation suggère très fortement que le transfert d'électron aboutissant à la génération du radical Ado• est similaire pour les enzymes radical-SAM. En dehors du domaine radical-SAM conservé, les structures de cette famille d'enzymes peuvent grandement varier et présenter des extensions N et C-terminales fonctionnalisées, impliquées dans la reconnaissance du substrat ou sa modification (Grell et al., 2015).

La sous-famille des enzymes radical-SAM possédant un domaine SPASM est un exemple de partie C-terminale coordonnant deux autres centres fer-soufre additionnels (Grell et al., 2015). Les travaux d'Haft et Basu montrent que ce domaine est très largement répandu chez les enzymes radical-SAM impliquées dans la maturation de peptides synthétisés par voie ribosomale (Haft and Basu, 2011). Le nom SPASM provient des enzymes, AlbA, PqqE, anSMEs et MftC, qui sont impliquées, respectivement, dans la maturation de la subtilosin A, la pyrroloquinoline quinone (PQQ), la sulfatase anaerobie et de la mycofactocin (Berteau et al., 2006; Flühe et al., 2012; Haft, 2011; Velterop et al., 1995). Plus de mille séquences protéiques présentant un domaine SPASM ont été identifiées (Grell et al., 2015). Généralement on répertorie au sein de cette sous-famille, la conservation d'un motif comprenant sept cystéines permettant la coordination de deux centres [4Fe-4S] additionnels, laissant ainsi un fer libre pour l'éventuelle coordination du substrat. Cependant la première structure d'une enzyme présentant un domaine SPASM, la déshydrogénase impliquée dans la maturation de la sulfatase anaerobie (anSMe), isolée de *C. perfringens*, a mis en évidence deux centres additionnels complètement coordonnés par les cystéines (Goldman et al., 2013a). La comparaison de cette structure avec celle de BtrN, une déshydrogénase impliquée dans la maturation de la butirosin B produite par *B. subtilis*, et avec celle de MoaA, impliquée dans la biosynthèse d'un cofacteur à molybdène, indique chez ces deux enzymes un domaine C-terminal plus court comportant un seul centre fer-soufre additionnel (Goldman et al., 2013b; Hänzelmann and Schindelin, 2004). Ces deux enzymes, présentant un seul centre additionnel, appartiennent à une autre sous-famille, celle des protéines radical-SAM à domaine Twitch (Grell et al., 2015).

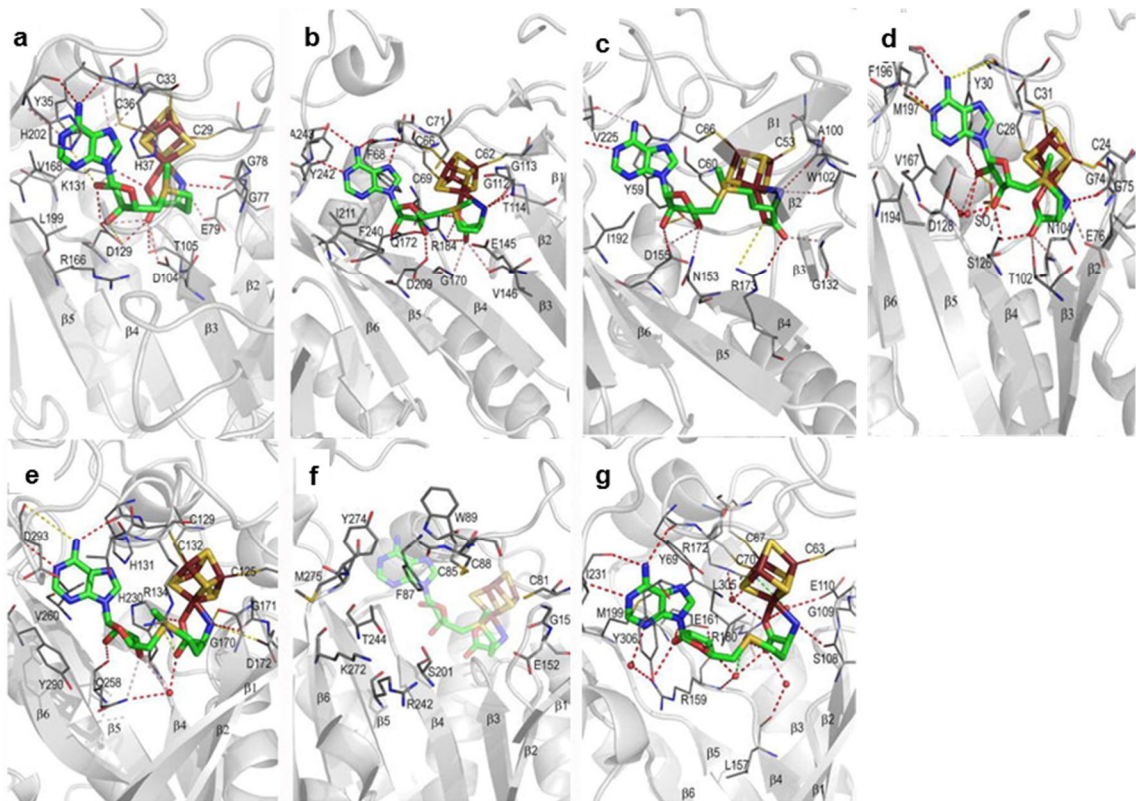


Figure 4.1 : Site de coordination de la SAM. La chaîne polypeptidique est en gris, la SAM et le centre [4Fe-4S] sont en bâtons (Carbone en vert, azote en bleu, fer en rouge et soufre en jaune). La figure représente les sites de coordination de **a** PFL-AE **b** HemN **c** BioB **d** MoeA **e** LAM **f** phTYW1 **g** HydE (adaptée de Vey and Drennan, 2011).

Depuis la caractérisation de l'enzyme anSMe de *C. perfringens*, trois autres structures d'enzymes présentant un domaine SPASM ont été résolues : SuiB impliquée dans la formation d'une liaison carbone-carbone (Lys-Trp) au sein d'un streptide (SuiB est une enzyme homologue à StrB présentée dans le chapitre 3) (Davis et al., 2017), CteB catalysant la formation de ponts thioéther sur CteA et SkfB, l'enzyme de maturation du sactipeptide Skf (Davis et al., 2017; Grell et al., 2018; Grove et al., 2017). La résolution des structures tridimensionnelles de ces dernières a permis d'émettre des hypothèses sur le mécanisme de reconnaissance du peptide par l'enzyme et sur le rôle des centres additionnels.

Les enzymes radical-SAM à domaine SPASM introduisent une grande diversité de modifications chimiques. L'enzyme anSMe catalyse la transformation d'une glycine de la chaîne polypeptidique en formylglycine (FGLy) sur la sulfatase anaérobie (Bertheau et al., 2006). Ce motif, essentiel à l'activité enzymatique, permet aux sulfatases de réduire les groupements sulfate par hydrolyse (Recksiek et al., 1998). Cette fonction est importante chez les bactéries et les humains, une activité réduite de l'enzyme est à l'origine de maladies chez l'homme (Dierks et al., 2003). L'enzyme Alba est responsable de la maturation de la subtilosin A, un sactipeptide

présentant une activité contre des pathogènes à Gram négatif et positif, potentiellement dangereux pour l'Homme (Flühe et al., 2012). L'enzyme PqqE est impliquée dans la synthèse du PQQ, un cofacteur rédox, à partir du précurseur peptidique PqqA. Après plusieurs réarrangements, initiés par la formation d'une liaison entre les chaînes latérales d'une tyrosine et d'un acide glutamique, PQQ est excisé de son précurseur pour être adressé à une autre enzyme (Velterop et al., 1995). L'enzyme MftC est essentielle à *Mycobacterium tuberculosis*, le pathogène responsable de la tuberculose. Elle catalyse la décarboxylation oxydative du précurseur MftA au cours de la biosynthèse de la mycofactin, dont la fonction exacte n'est pas connue (Khaliullin et al., 2016). Il a été montré par une délétion du gène *mftC*, que l'enzyme de maturation est essentielle à la croissance de *M. tuberculosis* (Griffin et al., 2011).

D'un point de vue structural, les enzymes à domaine SPASM coordinent deux centres fer-soufre par l'intermédiaire des sept cystéines d'une séquence consensus $CX_{9-15}GX_4CX_nCX_2CX_5CX_3CX_nC$. Nous avons vu qu'une première hypothèse était que les cystéines coordinent deux centres additionnels [4Fe-4S], en laissant un fer libre pouvant intervenir dans la liaison du substrat. Cependant la résolution de la structure de l'anSMe a mis en évidence deux centres complètement coordonnés, AuxI (pour centre additionnel I) à 16,9 Å du centre radical-SAM et AuxII (pour centre additionnel II) à 12,9 Å de AuxI. Le centre AuxI est coordiné par une cystéine présente sur la chaîne polypeptidique entre les deux domaines (radical-SAM et SPASM), les deux premières cystéines et la sixième du motif. Une épingle à cheveux β est présente entre les sites de coordination deux et trois, suivi par une hélice α ($\alpha 2'$). Cette dernière mène au deuxième centre additionnel qui est coordiné par les quatre cystéines restantes du motif (Figure 4.2 b) (Grell et al., 2015).

La comparaison structurale avec des enzymes radical-SAM à domaine Twitch montre certaines similitudes. Concernant l'enzyme MoeA, la distance entre le centre additionnel [4Fe-4S] et le centre radical-SAM est identique à celle entre le premier centre additionnel [4Fe-4S] et le centre radical-SAM chez l'anSMe, 16,9 Å. Le centre additionnel est coordiné par trois cystéines. On retrouve dans le domaine Twitch l'épingle à cheveux β et l'hélice α ($\alpha 2'$) qui n'est suivie d'aucune cystéine, laissant un site de coordination libre sur le centre [4Fe-4S], impliqué dans la liaison du substrat GTP (Figure 4.2 c) (Hänzelmann and Schindelin, 2006). La déshydrogénase BtrN, qui possède aussi un domaine Twitch, présente quant à elle un centre [4Fe-4S] complètement coordonné par quatre cystéines et une structure similaire à MoeA (Goldman et al., 2013b). Cependant la différence majeure vient des cystéines coordonnant ce centre, ici, à l'instar d'anSMe, des cystéines situées après l'hélice α ($\alpha 2'$) servent de ligands au centre [Fe-S] additionnel (Figure 4.2 d). Cette versatilité n'est pas propre au domaine Twitch, nous verrons qu'elle peut être étendue au domaine SPASM (Grell et al., 2015).

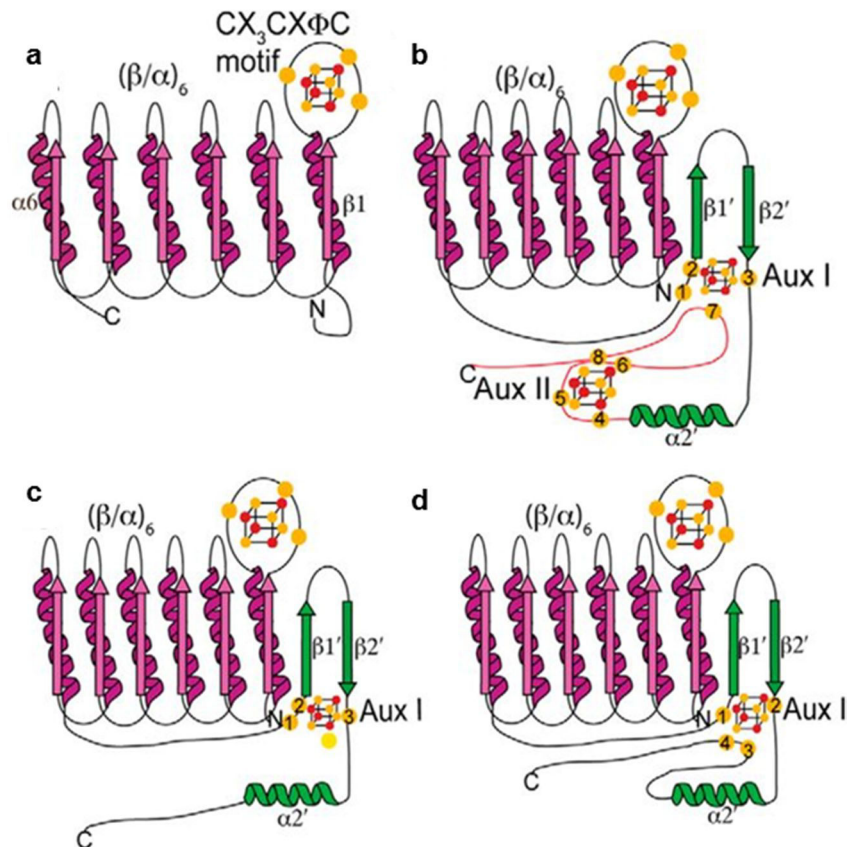


Figure 4.2 : Repliement des domaines radical-SAM, SPASM et Twitch. **a** Topologie générale du domaine radical-SAM. **b** Topologie générale du domaine SPASM, coordination complète des deux centres additionnels chez anSMe. **c** Topologie générale du domaine Twitch, coordination par trois cystéines du centre additionnel chez MoaA. **d** Topologie générale du domaine Twitch, coordination complète du centre additionnel chez BtrN (Grell et al., 2015).

4.2 Fonction des centres additionnels

La littérature mentionne différents rôles pour les centres [Fe-S] additionnels d'enzymes radical-SAM.

4.2.1 Relai d'électron

Les enzymes radical-SAM anSMe et BtrN présentent un domaine C-terminal différent (SPASM ou Twitch), mais possèdent toutes les deux une fonction déshydrogénase. Dans les deux structures, en présence ou non du substrat, les deux centres additionnels sont entièrement coordonnés par des cystéines. Les substrats des deux enzymes sont positionnés grâce à des liaisons hydrogène à une distance d'environ 9-10 Å des centres [4Fe-4S], suggérant que ces centres additionnels ne sont pas impliqués dans la déprotonation des substrats. Il a été mis en évidence pour anSMe, que l'Asp 277 joue un rôle clé. Une mutation de ce résidu réduit considérablement l'activité (0,8 % résiduel) (Goldman et al., 2013a). Pour BtrN, l'Arg 152 interagit avec le substrat au sein du site catalytique (Goldman et al., 2013b). La

distance entre ce site et les centres additionnels laisse supposer que ces derniers servent d'accepteur d'électrons lors de l'oxydation du substrat. Dans le cas de anSMe, les deux centres additionnels permettent un transfert des électrons à la surface de la protéine tandis que pour BtrN, seulement un centre est nécessaire au transfert des électrons vers un accepteur externe (Grell et al., 2015).

4.2.2 Coordination du substrat

L'enzyme MoaA est une enzyme radical-SAM à domaine Twitch participant à la première étape dans la biosynthèse de cofacteur molybdène (Moco). Cette étape est la conversion du GTP en précurseur Z. Il a été mis en évidence par cristallographie et spectroscopie ENDOR que le GTP interagit avec le centre additionnel [4Fe-4S] de MoaA par sa base nucléique. Les atomes d'azote N3 et N2 de la guanosine coordinent le fer libre tandis que l'atome d'oxygène O6 interagit avec un des atomes de soufre du centre additionnel, permettant ainsi de positionner le GTP au sein de l'enzyme et d'initier sa transformation (Hänzelmann and Schindelin, 2006; Lees et al., 2009).

4.2.3 Donneur de soufre

D'autres enzymes radical-SAM présentent des centres additionnels qui ne sont pas présents au sein d'un domaine SPASM ou Twitch. L'enzyme BioB, possède en plus de son centre radical-SAM, un centre [2Fe-2S] utilisé de manière sacrificielle comme source de soufre nécessaire à la biosynthèse de la biotine (Ugulava et al., 2001). De la même manière, Lip A présente un deuxième centre [4Fe-4S], source de deux atomes de soufre nécessaires à la synthèse de l'acide lipoïque (Cicchillo and Booker, 2005).

4.2.4 Activateur de co-substrat

Les méthylthiotransférases sont des enzymes permettant le transfert d'un groupement thiométhyle sur un substrat macromoléculaire, tel que la protéine S12 du ribosome pour RimO et l'ARNt-A37 pour MiaB. Ces deux enzymes présentent un centre [4Fe-4S] additionnel, cependant ce dernier n'est pas utilisé comme un donneur sacrificiel de soufre. Les études biochimiques et structurales de ces deux enzymes ont montré que ces centres présentent un site de coordination libre permettant d'activer un donneur de soufre externe (sulfure ou méthylsulfure) (Forouhar et al., 2013).

La fonction des centres Fe-S additionnels n'est pas complètement élucidée pour toutes les enzymes radical-SAM présentant un domaine SPASM ou Twitch. Dans le cas des ponts thioéther formés par un mécanisme radicalaire, la résolution des structures de CteB et SkfB a permis d'émettre des hypothèses sur le mécanisme de maturation de ces peptides (Grell et al., 2018; Grove et al., 2017). Ces deux structures seront détaillées dans la suite de ce chapitre.

4.3 RumMc1 et RumMc2

Les séquences de RumMc1 et RumMc2, présentent dans leurs parties C-terminales des résidus cystéines conservés. L'alignement des séquences de RumMc1 et RumMc2 avec celles de AlbA, et anSMe, suggère que RumMc1 et RumMc2 sont des enzymes radical-SAM possédant un domaine SPASM, avec très probablement deux centres [4Fe-4S] additionnels (Figure 4.3).

Deux points importants sont à relever de cet alignement. Le premier est la conservation de la cystéine C255 présente chez anSME correspondant à C384 et C386 dans RumMc1 et RumMc2, respectivement. Cette cystéine située entre les deux domaines, radical-SAM et SPASM est impliquée dans la coordination du centre additionnel I, ce qui suggère une coordination complète de ce centre dans RumMc1 et RumMc2. Le second point est la présence de cystéines supplémentaires au sein du domaine SPASM chez RumMc1 (C392, C464) et RumMc2 (C394, C466), ces cystéines peuvent potentiellement intervenir dans la coordination des centres additionnels. Nous supposons donc que les enzymes RumMc possèdent trois centres [4F-4S], le centre radical-SAM, et deux centres additionnels au sein d'un domaine SPASM. Les travaux de cette thèse se sont focalisés sur l'étude de RumMc1. Nous présenterons deux méthodes d'obtention de l'holo-enzyme. Les données issues de la caractérisation spectroscopique seront discutées afin d'émettre des hypothèses sur le mécanisme de maturation des peptides RumC.

Chapitre 4 – Caractérisation de l'enzyme radical-SAM RumMc1

AlbA	MFIEQMFPFFINESVRVHQL-PEGVLE---IDYL RDNVSISDFEYLDLNKTAYELCMRMD	56
anSMe	-----	0
RumMc1	--MKEHLKKIKETIDVERGYSLGTVFTTRNKQYMYDTGTGKVF---ECGVNEYRILKSLF	55
RumMc2	MKAKEHLKKIKGTIDVERGYSLGTVFTTRNKQYMYDTGTGKVF---ECGANEQIILKSLF	57
AlbA	GQKTAEQILAEQCAVYDESPEDHKDWYYDMLNMLQNQVIQLGNRASRHTITTTSGSNE--	114
anSMe	-----	0
RumMc1	EQTS----LPD--KVDGVSEEELEAAYRNIWEMVEAEHILQVSPNLKFFVRETDETLRDLL	109
RumMc2	EQTS----LPE--KVEGSSEEELEAAYRNIWEMIE TEHILQISPDLKFFVKETDETLRDLL	111
AlbA	FPMLPHATFELTHRCNLKCAHCYLESSPEALGTVSIEQ-----FKKTADMLFDN--GVL T	167
anSMe	MPPLSLLIKPASSGCNLKCTYCFYHSLSDNRNVKSYGIMRDEVLESMVKRVLNEANGHCS	60
RumMc1	RYDLQQVILELLETCNMRCRYCIYNEHNEGYNRNFSPKAMTWDVAKRAVEYARDNSGDKVA	169
RumMc2	RYDLQQVILELLETCNMRCRYCIYNEHNEGYNRNFSPKAMTWEVAKRAVEYARDNSGDKVA	171
	: **:* : * . . : *	: . . :: . :
AlbA	CEITGGEIFVHPN--ANEILDYVCK-F---KKVAVLTNGTLMRKESLELLKTYKQKII	220
anSMe	FAFQGGEP TLAGLEFFEKLMELQRKHNYKNLKIYNSLQTNGTLIDESWAKFL-S-ENKFL	118
RumMc1	ISFYGGEP LQV-FELMKTIDYSRQI-IKGKELTFSFSTNLTLVTP EIAAYV-AGVEGMS	226
RumMc2	VSFYGGEP LQV-FELMKTIDYSRQI-IKGKELTFSFSTNLTLVTP EIAAYV-AGVEGMS	228
	: *** :	:: :: :
AlbA	VGISLDSVNSEVHDSFR---GRKGSFAQTCKTIKLLSDH-GI-----	258
anSMe	VGLSMDGP-KEIHNLNRKDCCGLDTFSKVERAAELFK---KY---KVEFNILCVVTSN	169
RumMc1	VLASIDGP-EGIHDAYRVMSSGGKGSFEKAIQGLKYLVEAFGERAKESIVINTVVCPP--F	283
RumMc2	VLASIDGP-EKIHDAYRVMSSGGKGSFGKAIQGLKYLVEAFGERAKESIVINTVVCPP--F	285
	* **:. . : * . : * . : *	:: * . : :
AlbA	---FVRVAMSVFEKNMWEIHDMAQKVRDL-----GAKAFSY-----	291
anSMe	TARHVNKVKYKFKKDFKFLQFI-NCLDPLYEEKGKYNYS LKPKDYTKFL-----KN	220
RumMc1	SAKKLDAIKEFFEGLSWLPKEMVKKCDYVEYGSVREEDI SMEYAGDGEFVGEELDGFTLD	343
RumMc2	SAKKLDAIKEFFEGLNWLPKEMVKKCDYVEYGSVREEDI SMEYAGDGEFVGEELDGFTLD	345
	:	* . : :
AlbA	---NWVDDFGRGRDIVHPTKDAEQHRKFMEYEQHVIDEFKDLIPII-----P-YERK	339
anSMe	LFDFWYEDFLNGNRV-----SIRYFDGLL---ETILLGKSS-----SC---G	256
RumMc1	AIEGWALARDLEED-----PKSYVAGIV---ADKLVRIHNRRTQEPCKDLR	388
RumMc2	AIEGWALTRDLEEQD-----PKSYVAGIV---TDKLVRIHNRRTQEPCKDLR	390
	*	. : :
AlbA	RAANCGAGWKSIVISPFGEVRCALFP-KEFSLGNI FHDSYESIFNSPLVHKLWQAQAPR	398
anSMe	MNGTCT---CQFVVESDGSVYPCDFYVLDKWRNLGNIQDMTMKELFETNKNHEFIKL---S	310
RumMc1	RNGCCI PGNRRVYKTDGKFLLEKGTG-DAPDIGNVFEGADLEKIKKYYIEEY-----D	441
RumMc2	RNGCCI PGNRRVYKADGKFLLEKGTG-DAPDIGNVFEGADLEKIKKYYIEEY-----D	443
	. *	. : * . : * . : ** : . : . : . . :
AlbA	FSEHCMKDKCPFSGYGGCYLKGLNSNKY-----HRKNICSWAKNEQL-----	441
anSMe	FKVHEECKKCKWFR---ICKGGCRRCRDSKEDSALELNYCQSYK-----EFFEY-----	357
RumMc1	EKSITRCNECWARNLCGLCYAACYEAGIDME---RKEKVC GAHRYATKGELISYYSILE	498
RumMc2	EKSLTRCNECWARNLCGLCYAACYEAGIDME---RKEKVC GAHRYATKGELISYYSILE	500
	.	::* * : * :
AlbA	--EDVVQLI-----	448
anSMe	AFPRLINVANNIK--	370
RumMc1	EKPEVIEEIDAVPYY	513
RumMc2	EKPEVIEEIDAVPYY	515
	:::	

Figure 4.3 : Alignement des séquences d'enzymes radical-SAM à domaine SPASM (anSMe, AlbA, RumMc1 et RumMc2). En rouge les cystéines impliquées dans la coordination du centre radical-SAM. En vert celles impliquées dans la coordination des centres additionnels. « * » résidus conservés, « : » résidus aux propriétés très proches (scoring > 0,5), « . » résidus aux propriétés moins proches (scoring < 0,5).

4.4 Production et purification de l'enzyme RumMc1

A ce stade, deux méthodes ont été mises en œuvre pour obtenir la protéine RumMc1 sous sa forme holo, un protocole aérobie et un protocole anaérobie.

4.4.1 Protocole aérobie, purification de la forme apo de l'enzyme RumMc1

L'obtention de la protéine RumMc1 en aérobie impose de purifier cette protéine sous sa forme apo puis de réaliser une reconstitution des centres métalliques en atmosphère inerte.

La surexpression hétérologue de la protéine RumMc1 est faite dans une souche d'*E. coli* BL21(DE3), transformée par le plasmide pET-15b-*rumMc1* permettant l'expression de l'enzyme RumMc1 avec une étiquette histidine à l'extrémité N-terminale. Cette souche est cultivée dans un milieu minimum M9. La surproduction de la protéine est induite par l'ajout d'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (1 mM final) lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,8. La culture est poursuivie 15 h à 25 °C.

La lyse des cellules se fait par sonication et les extraits solubles contenant RumMc1 sont obtenus par ultracentrifugation. L'extrait soluble est injecté sur une colonne à ions métalliques immobilisés (colonne Ni-NTA pour *Nickel-nitrolotriacetic acid*) permettant de purifier la protéine RumMc1 après élution à l'imidazole (Figure 4.4 a). L'analyse par gel SDS-PAGE, montre une bande correspondant à RumMc1 aux alentours de 60 kDa en accord avec la masse théorique de 58 606 Da (Figure 4.4 b).

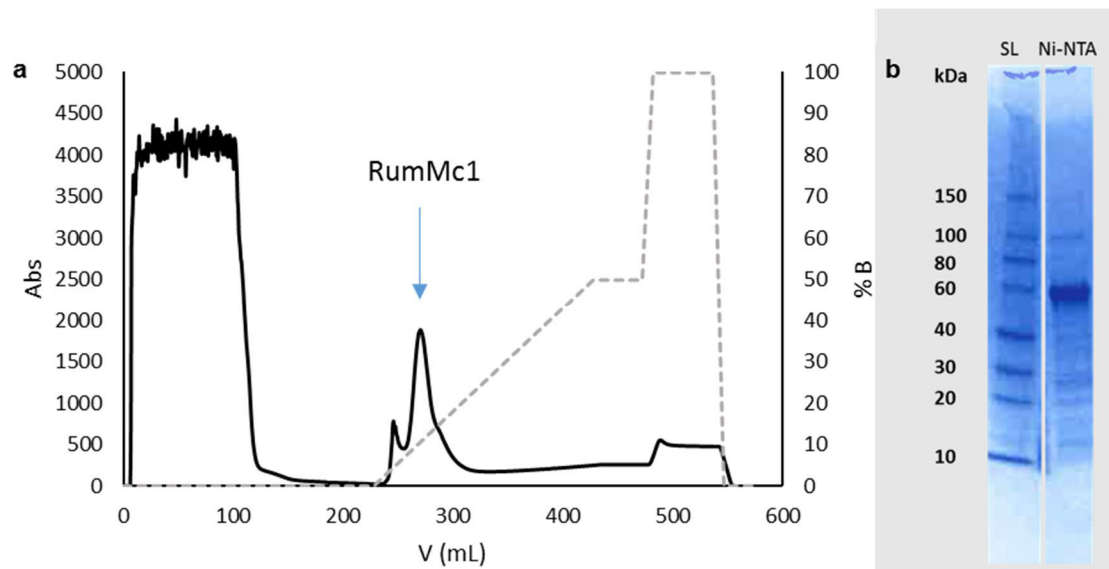


Figure 4.4 : Chromatographie d'affinité de RumMc1. **a** Profil d'élution de l'enzyme RumMc1, sur colonne Ni-NTA. Le gradient en présence d'imidazole, permet d'éliminer les impuretés et d'obtenir RumMc1. **b** Gel SDS-PAGE de la purification de RumMc1. SL : Echelle de poids moléculaires, Ni-NTA : Pic élué correspondant à RumMc1.

L'apoprotéine est préparée en présence de dithionite, un agent réducteur, à une concentration de 10 mM et d'EDTA, un chélateur de métaux à une concentration de 5 mM. L'échantillon est ensuite laissé pendant 15 h. La protéine RumMc1 est ensuite purifiée par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex 200 (pour des protéines de poids moléculaires compris entre 10 kDa et 600 kDa). La protéine RumMc1 est éluée à un volume d'environ 78 mL (Figure 4.5 **a**). La pureté de la protéine est évaluée par gel SDS-PAGE (Figure 4.5 **b**). Après concentration l'apoprotéine RumMc1 est dosée par spectroscopie UV-Visible (Figure 4.7 **c**).

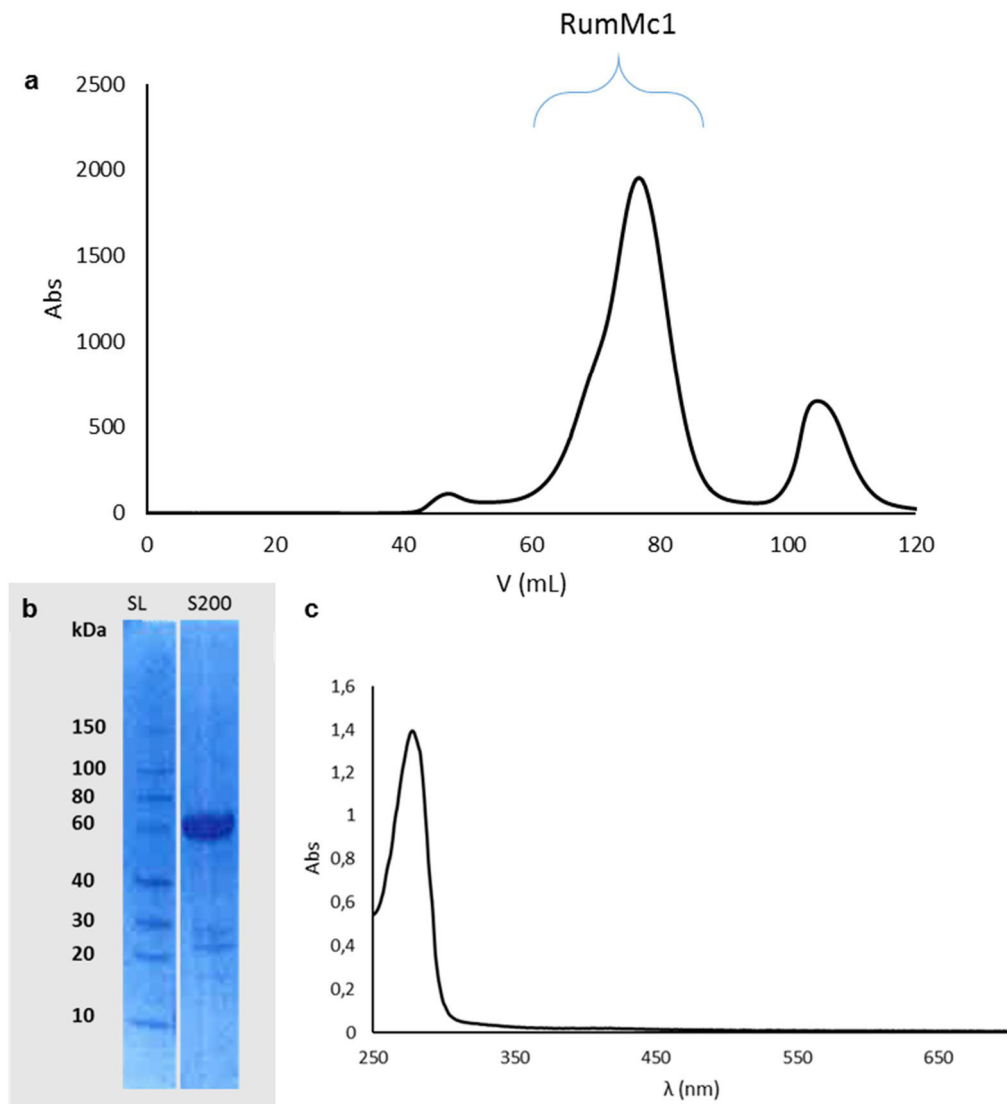


Figure 4.5 : Chromatographie d'exclusion de taille de RumMc1. **a** Profil d'élution de l'enzyme RumMc1 sous forme apo, sur colonne Superdex 200. **b** Gel SDS-PAGE de la purification de RumMc1. SL : Echelle de poids moléculaires, S200 : Pic élué correspondant à RumMc1. **c** Spectre UV-Visible de l'apoprotéine RumMc1.

4.4.2 Protocole aérobie, reconstitution des centres fer-soufre

La reconstitution des centres [Fe-S], permettant d'obtenir l'holoenzyme RumMc1, se fait en boîte à gants. L'apoprotéine (100 μ M) est mise en présence d'un excès de DTT (5 mM), un agent réducteur permettant de réduire d'éventuels ponts disulfure présents dans la protéine, de L-cystéine (1,5 mM), source de soufre, de sel de Mohr $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ (1,5 mM), source de fer et enfin d'une quantité catalytique de cystéine désulfurase (CSDA, *E. coli*, 2 μ M). La réaction de reconstitution des centres [Fe-S] est suivie par spectroscopie UV-Visible, par l'enregistrement de spectres successifs entre 200 nm et 700 nm. L'augmentation de l'absorbance à 420 nm permet de visualiser la reconstitution des centres [Fe-S]. Cette absorbance correspond à la bande de transfert de charges du ligand (soufre) vers le métal (Fe^{3+}). Une fois que celle-ci atteint un plateau, la réaction est arrêtée (Figure 4.6 **a**). Afin d'éliminer les réactifs présents dans le milieu, la protéine est purifiée sur colonne NAP-25, concentrée et finalement dosée par spectroscopie UV-Visible (Figure 4.6 **b**).

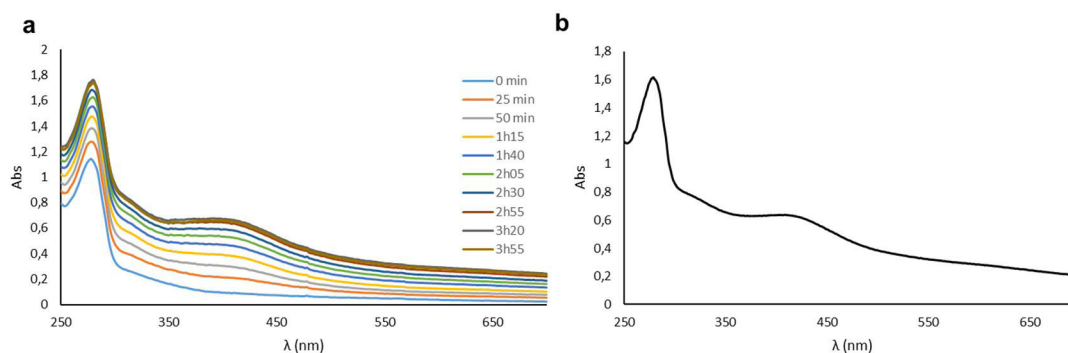


Figure 4.6 : Reconstitution des centres [Fe-S] de RumMc1. **a** Suivi de la reconstitution des centres [Fe-S] par spectroscopie UV-Visible, augmentation de l'absorption à 420 nm. **b** Spectre UV-Visible de l'holoenzyme RumMc1.

4.4.3 Protocole anaérobie, purification de la forme holo de l'enzyme RumMc1

La seconde méthode pour obtenir RumMc1 est de purifier cette protéine directement en boîte à gants, sous atmosphère inerte. La surexpression hétérologue de la protéine RumMc1 est faite dans une souche d'*E. coli* BL21(DE3), transformée par le plasmide pET-15b-*rumMc1* en présence d'un plasmide encodant une machinerie d'assemblage des centres [Fe-S] (pDB1282-*isc* ou PACYCDuet-1-*suf*). La culture de cette souche se fait en milieu minimum M9, complété par du FeCl_3 (50 μ M). Lors de l'induction de la production de la protéine par l'IPTG (1 mM) à une densité optique de 0,8, le milieu de culture est complété avec l'ajout de L-cystéine (300 μ M) et de FeCl_3 (100 μ M). La culture est ensuite poursuivie 15 h à 25 °C.

L'ensemble du protocole de purification de la protéine RumMc1 est réalisé en boîte à gants. La lyse des cellules se fait par sonication et les extraits solubles, contenant RumMc1, sont obtenus par ultracentrifugation. Le protocole de

purification est constitué d'une étape de chromatographie d'affinité. L'extrait soluble est injecté sur une colonne Ni-NTA. La protéine RumMc1 est ensuite éluée par un gradient d'imidazole (Figure 4.7 a). La présence ou non de l'enzyme RumMc1 au cours de la purification est suivie par gel SDS-PAGE. Après cette étape, une bande correspondant à la maturase RumMc1 est obtenue aux alentours de 60 kDa en accord avec la masse attendue de 58 606 Da (Figure 4. b). Après concentration la protéine holo-RumMc1 est purifiée sur colonne NAP 25 et finalement dosée par spectroscopie UV-Visible (Figure 4.7 c).

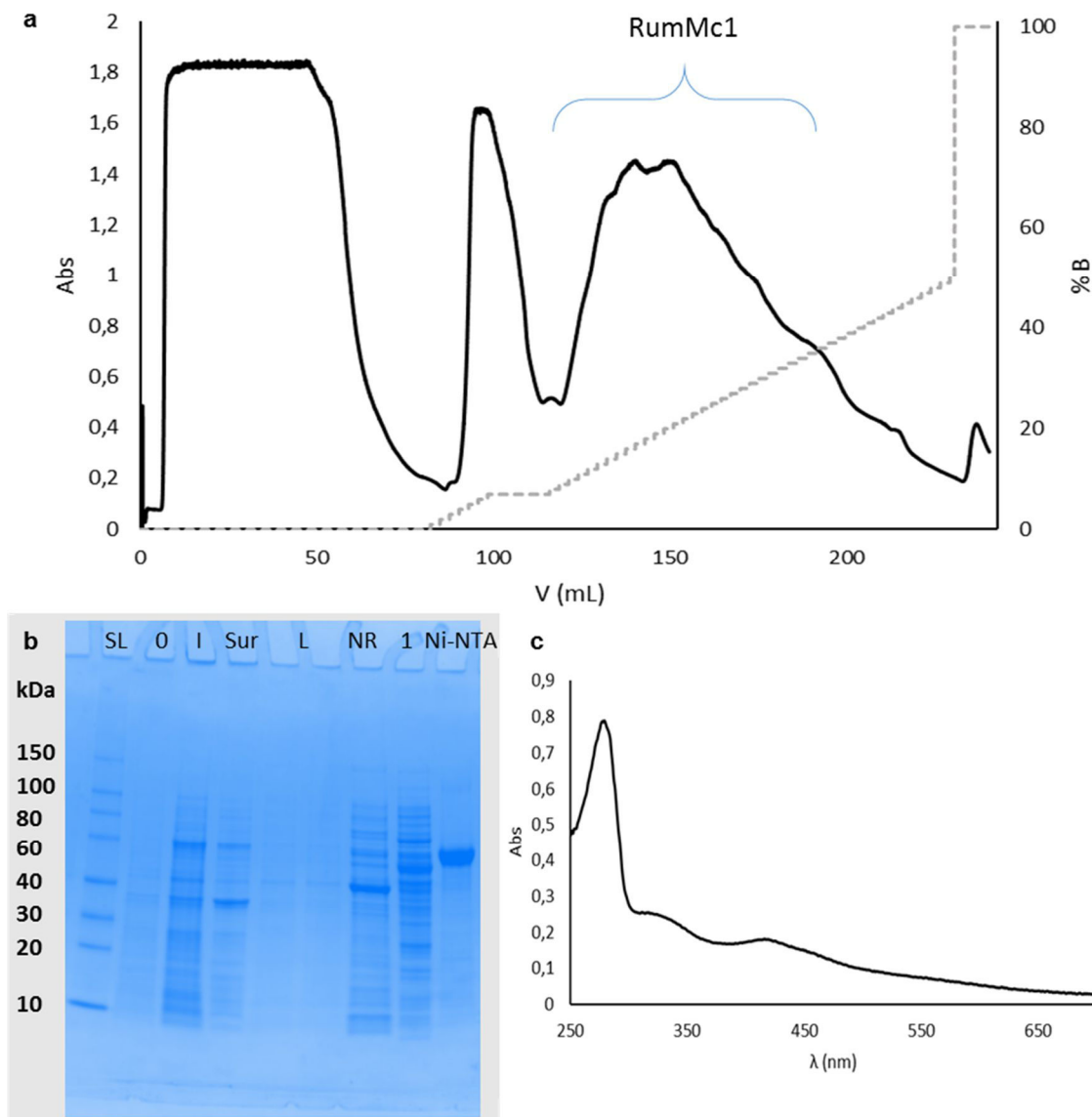


Figure 4.7 : Purification de holo-RumMc1. **a** Profil d'éluion de l'holoenzyme RumMc1 sur colonne Ni-NTA. Le gradient en tampon E, permet d'éliminer les impuretés et d'obtenir RumMc1 pure. **b** Gel SDS-PAGE de la purification de RumMc1. SL : Echelle de poids moléculaires, 0 : milieu non induit, I : milieu induit, Sur : Surnageant (extraits solubles), L : Lavage de la colonne, NR : Non retenu, 1 : Impuretés, Ni-NTA : Pic élué correspondant à RumMc1. **c** Spectre UV-Visible de l'holoenzyme RumMc1.

4.4.4 Dosage du fer de holo-RumMc1

Tout d'abord, nous pouvons nous intéresser aux spectres UV-Visible de la forme holo-RumMc1 obtenue par les deux méthodes. Le rapport de l'absorbance à 420 nm (bande de transfert de charge du ligand vers le métal) et de l'absorbance à 280 nm (transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ dans les acides α -aminés aromatiques), renseigne sur la contenance en centres [Fe-S]. Le rapport obtenu pour RumMc1 issue de la reconstitution est de 0,39 (Figure 4.6 **b**) tandis que celui pour RumMc1 purifiée en boîte à gants est de 0,23 (Figure 4.7 **c**). Ce résultat indique qu'il y a moins de fer dans l'échantillon purifié en anaérobiose de holo-RumMc1.

Dosage du fer par la méthode de Fish

Le dosage du fer sur les deux enzymes holo-RumMc1 a été réalisé par la méthode de Fish (Fish, 1988). L'ensemble des résultats obtenus montre que la protéine holo-RumMc1 reconstituée contient $13 \pm 3,1$ atomes de fer par RumMc1, ce qui est cohérent avec la présence de trois centres [4Fe-4S]. La valeur de l'écart-indique que cette technique de reconstitution ne génère pas des populations homogènes d'enzyme. Ceci est en grande partie lié au fait que la protéine RumMc1 a tendance à précipiter lors de l'ajout de fer. Dans le cas de la protéine RumMc1 purifiée en anaérobiose, directement sous sa forme holo, on obtient $9 \pm 0,6$ atomes de fer par protéine. Cette valeur plus faible en nombre de fer suggère que les centres Fe-S ne sont pas tous reconstitués sur l'ensemble de l'échantillon purifié ou qu'une partie du fer a été perdue en cours de la purification.

4.5 Caractérisation biophysique de RumMc1

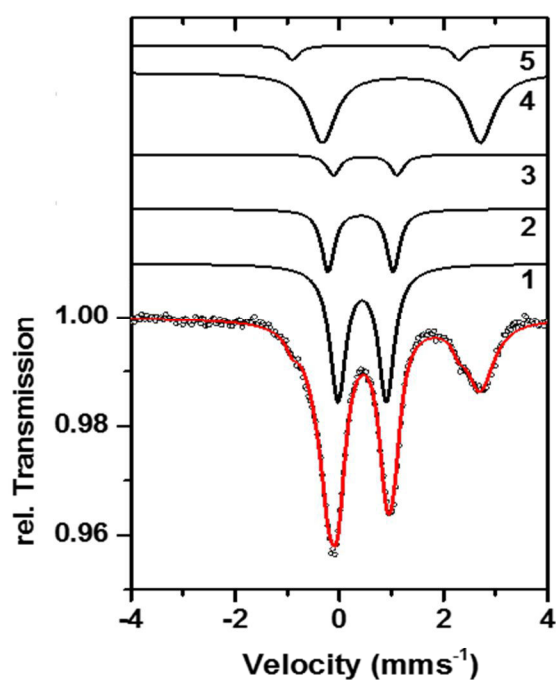
La caractérisation de la protéine holo-RumMc1 a été abordée par les spectroscopies Mössbauer et RPE.

4.5.1 Caractérisation de l'état oxydé de RumMc1 par spectroscopie Mössbauer

L'étude par spectroscopie Mössbauer a été réalisée en collaboration avec Volker Schüneman et Christina Müller de l'Université technique de Kaiserslautern.

Dans un premier temps nous avons analysé le spectre Mössbauer de holo-RumMc1 reconstituée en boîte à gants avec du $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$. Le spectre expérimental est en points noirs et sa simulation est en rouge (Figure 4.8). Afin d'obtenir cette simulation satisfaisante, cinq jeux de paramètres ont été nécessaires. Le spectre 1 avec les paramètres ($\delta = 0,44$ mm/s, $\Delta E_Q = 0,93$ mm/s) correspond à un centre [4Fe-4S] $^{2+}$ classique avec quatre cystéines comme ligands des quatre atomes de fer et représente 41 % du fer total. Le spectre 2 avec les paramètres ($\delta = 0,41$ mm/s, $\Delta E_Q = 1,25$ mm/s) correspond à un centre [4Fe-4S] $^{2+}$ possédant un ligand non-cysteine et représente 15 % du fer total. Le spectre 3 avec les paramètres ($\delta = 0,50$ mm/s, $\Delta E_Q = 1,22$ mm/s) est attribué à un centre [3Fe-4S] $^{1+}$ issu très probablement de la dégradation d'un centre [4Fe-4S] $^{2+}$ et représente 5 % du fer total. Enfin Les deux

derniers spectres 4 et 5 dont les paramètres ($\delta = 1,19 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 3,03 \text{ mm/s}$ et $\delta = 0,70 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 3,20 \text{ mm/s}$) correspondent à du Fe^{2+} et Fe^{3+} respectivement et représentent 40 % de l'échantillon.



	1	2	3	4	5
	2x 4Fe4S	2x 4Fe4S-Cys	1x 4Fe4S- libre	Fe(II)	Fe(II)-4S
$\delta \text{ (mm/s)}$	0,44 ($\pm 0,01$)	0,41 ($\pm 0,01$)	0,50 ($\pm 0,01$)	1,19 ($\pm 0,01$)	0,70 ($\pm 0,03$)
$\Delta E_Q \text{ (mm/s)}$	0,93 ($\pm 0,01$)	1,25 ($\pm 0,01$)	1,22 ($\pm 0,01$)	3,03 ($\pm 0,01$)	3,20 ($\pm 0,03$)
$G \text{ (mm/s)}$	0,37 ($\pm 0,01$)	0,30 ($\pm 0,01$)	0,30 ($\pm 0,01$)	0,63 ($\pm 0,02$)	0,30 ($\pm 0,0$)
Area (%)	41 (± 1)	15 (± 1)	5 (± 1)	35,5 (± 1)	3,5 (± 1)

Figure 4.8 : Spectre Mössbauer de holo-RumMc1 après reconstitution des centres [4Fe-4S] avec du ^{57}Fe en boîte à gants. RumMc1 a été ensuite directement congelée en boîte à gants dans une cellule Mössbauer ($V=400 \mu\text{L}$ à $192 \mu\text{M}$). Le spectre expérimental est en points noirs accompagné de la simulation en rouge. Les composantes 1, 2, 3, 4, 5 qui ont servi au calcul de la simulation sont en trait plein noir. Le spectre a été enregistré à 77 K.

Pour obtenir RumMc1 purifiée sous sa forme holo, la culture de la protéine a été faite en présence de $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$. Le spectre expérimental est en points noirs et sa simulation est en rouge (Figure 4.9). La simulation du spectre expérimental est obtenue en utilisant cette fois-ci uniquement trois jeux de paramètres. Le spectre 1 avec les paramètres ($\delta = 0,42 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 0,98 \text{ mm/s}$) correspond à un centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ classique avec quatre cystéines comme ligands des quatre atomes de fer et représente 50 % du fer total. Le spectre 2 avec les paramètres ($\delta = 0,44 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q = 1,30 \text{ mm/s}$) correspond à un centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ possédant un ligand non-cysteine et représente 25 % du fer total. Le spectre 3 avec les paramètres ($\delta = 0,33 \text{ mm/s}$, $\Delta E_Q =$

0,49 mm/s) est attribué à un centre $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ issu très probablement de la dégradation d'un centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ et représente 25 % du fer total.

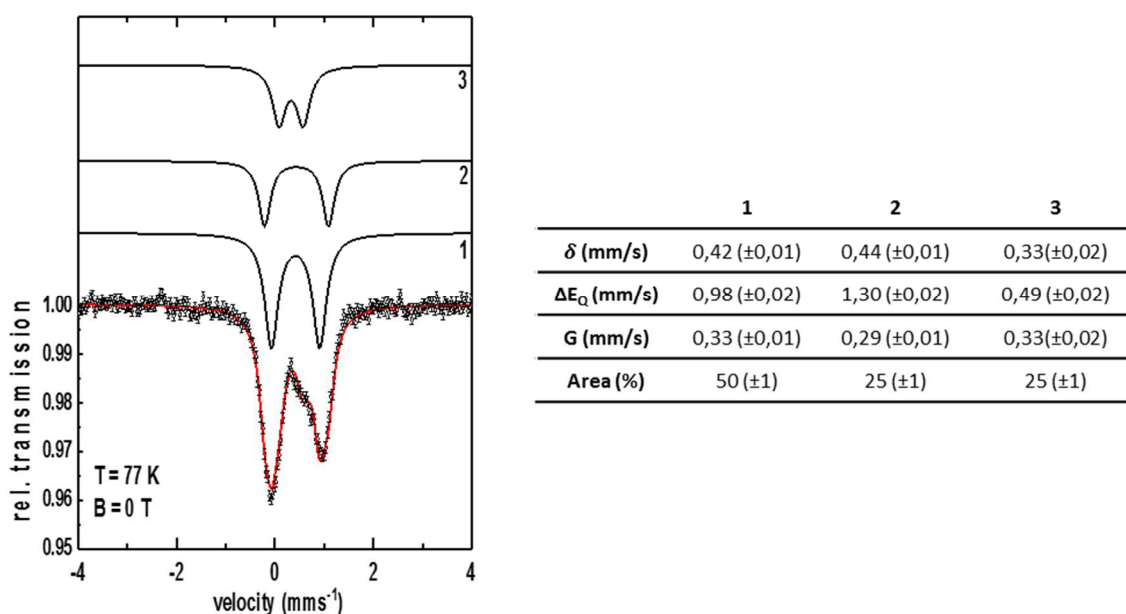


Figure 4.9 : Spectre Mössbauer de holo-RumMc1 après culture dans un milieu contenant du ^{57}Fe . RumMc1 a été purifiée et congelée en boîte à gants dans une cellule Mössbauer ($V=400 \mu\text{L}$ à $192 \mu\text{M}$). Le spectre expérimental est en points noirs accompagné de la simulation en rouge. Les composantes 1, 2, 3, qui ont servi au calcul de la simulation sont en trait plein noir. Le spectre a été enregistré à 77 K.

La caractérisation par spectroscopie Mössbauer de RumMc1 obtenue par reconstitution chimique des centres $[\text{Fe-S}]$ ou par obtention de l'holo-RumMc1 de façon anaérobie a permis de mettre en évidence que RumMc1 peut fixer trois centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. Ce résultat confirme la prédiction faite à partir de l'alignement de séquences. L'analyse montre aussi que la forme de RumMc1 obtenue sans reconstitution chimique est plus homogène avec moins de $\text{Fe}^{2+/3+}$ non spécifique.

Le spectre Mössbauer de holo-RumMc1 a aussi été enregistré en présence de SAM, cofacteur de l'enzyme. Il est identique à celui obtenu sans SAM, et peut être simulé avec les mêmes trois composantes (Figure 4.10). La littérature indique qu'une interaction aurait provoqué un changement drastique du paramètre δ , comme il a été observé chez HemN (Coproporphyrinogen III Oxidase) (augmentation à 0,66 mm/s) (Layer et al., 2005). Concernant RumMc1, l'interaction de la SAM avec le centre radical-SAM concerne un atome de fer sur douze présents dans l'enzyme. Il est donc probable que cette interaction ne soit pas détectable par spectroscopie Mössbauer. Il faut rappeler que dans le cas de HemN l'enzyme ne contient qu'un seul centre $[4\text{Fe-4S}]$ soit donc un atome de fer sur quatre concerné par l'interaction avec la SAM.

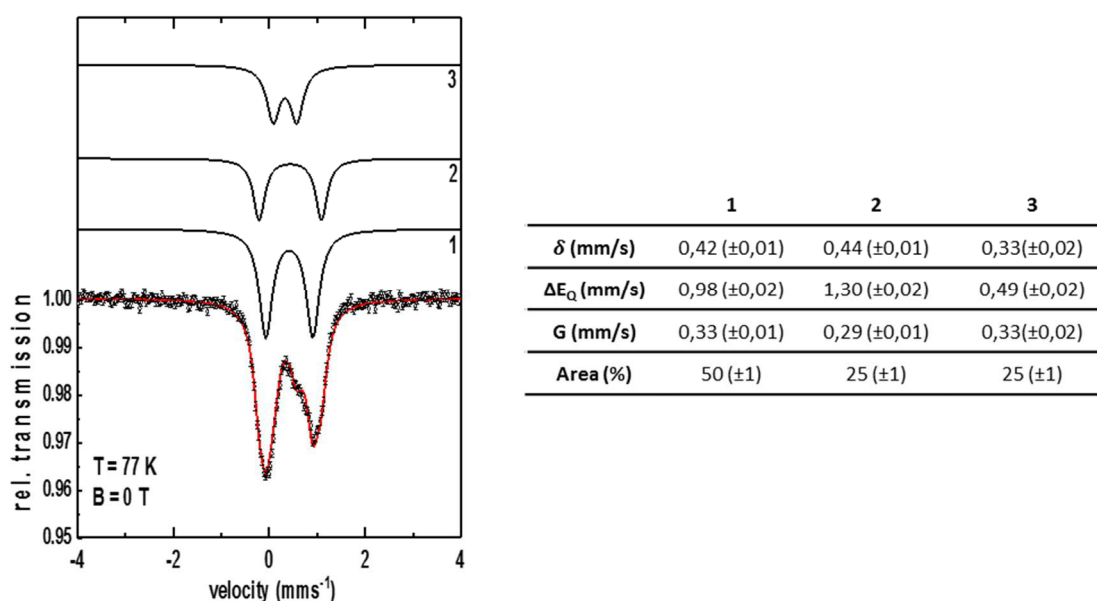


Figure 4.10 : Spectre Mössbauer de holo-RumMc1 après culture dans un milieu contenant du ^{57}Fe . RumMc1 a été purifiée, puis incubée avec de la SAM (1 mM final) congelée en boîte à gants dans une cellule Mössbauer ($V=400 \mu\text{L}$ à $192 \mu\text{M}$). Le spectre expérimental est en points noirs accompagné de la simulation en rouge. Les composantes 1, 2, 3, qui ont servi au calcul de la simulation sont en trait plein noir. Le spectre a été enregistré à 77 K.

4.5.2 Caractérisation de l'état réduit de RumMc1 par spectroscopie RPE

Les centres $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ possède un spin total $S = 0$ et sont donc diamagnétiques. Pour les étudier par spectroscopie RPE à basse température, les centres $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ sont réduits à l'état $[\text{4Fe-4S}]^+$ ayant un spin total de $S = \frac{1}{2}$ et détectable par RPE. La réduction des centres $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ en $[\text{4Fe-4S}]^+$ de l'holo-RumMc1 est réalisée en boîte à gants en présence de dithionite et la réaction de réduction est suivie par spectrophotométrie UV-visible ou l'on suit la diminution de l'absorbance à 420 nm caractéristique des centres $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ comme indiqué dans la Figure 4.11.

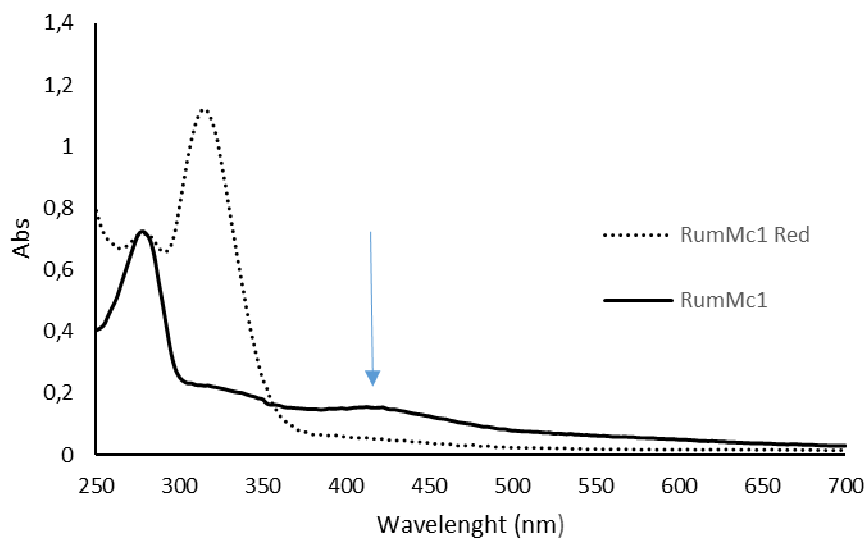


Figure 4.11 : Suivi par spectroscopie UV-Visible de la réduction des centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ de RumMc1 à l'état $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$.

Une fois la cinétique de réduction terminée, la solution protéique est transférée dans un tube RPE et la solution est congelée dans la boîte à gants. Les spectres ont été enregistrés dans des conditions de non saturation du signal à 10 K et à 30 db. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Stéphane Torelli et Laurent Le Pape dans le groupe BioCE du LCBM.

Le spectre enregistré est en noir (Figure 4.12). Ce signal composite centré à $g \approx 2$ est caractéristique de la présence de plusieurs centres $[4\text{Fe-4S}]^+$. En effet, la simulation de ce signal n'est possible que par la prise en compte de trois composantes chacune avec un jeu de paramètres uniques. La première composante est le spectre bleu (A) dont les paramètres sont : $g_{A1} = 2,034$ mT $g_{A2} = 1,913$ mT $g_{A3} = 1,870$ mT. Le deuxième jeu de paramètres ($g_{B1} = 2,050$ mT $g_{B2} = 1,937$ mT $g_{B3} = 1,902$ mT) est attribué au spectre vert (composante B) alors que la troisième composante C (spectre rose) possède les paramètres $g_{C1} = 2,074$ mT, $g_{C2} = 1,932$ mT et $g_{C3} = 1,885$ mT. La prise en compte de ses trois composantes permet l'obtention du spectre rouge reproduisant toutes les caractéristiques du spectre expérimental.

Au final l'analyse de l'état oxydé par spectroscopie Mössbauer et la caractérisation de l'état réduit par spectroscopie RPE permet de conclure que l'enzyme RumMc1 est capable de coordonner trois centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+/+}$ en accord avec la prédiction de la séquence de la protéine et de l'alignement des séquences avec des enzymes analogues.

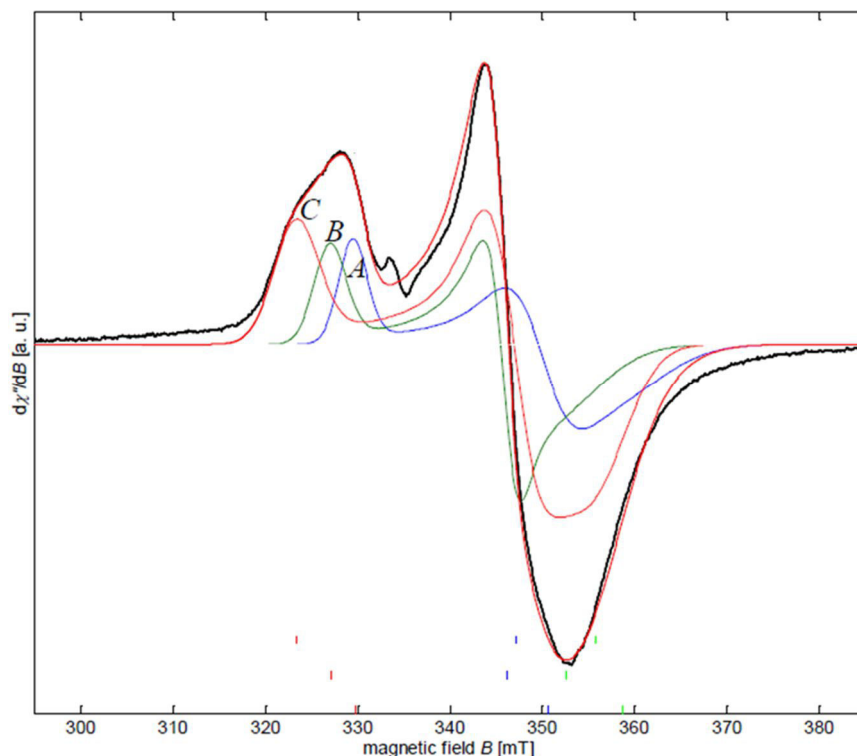


Figure 4.12 : Spectre RPE de l'holoenzyme RumMc1 (200 μ M). Les centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ ont été réduits par l'ajout de dithionite (10 mM final).

La SAM, cofacteur de RumMc1 a été ajoutée à holo-RumMc1, afin de voir son effet sur les centres $[4\text{Fe-4S}]^+$ et donc sur le signal RPE. L'ajout de cette dernière induit un changement clair dans le signal enregistré, en noir (Figure 4.13). Cette fois-ci, la simulation du signal (rouge) résulte de quatre composantes. Les composantes B (vert) et C (rose) sont inchangées par rapport à holo-RumMc1 réduite. Seule la composante A initiale est maintenant simulée par la composante A (turquoise) de paramètres $g_{A1} = 2,035$ mT, $g_{A2} = 1,910$ mT, $g_{A3} = 1,860$ mT et A' (bleu) de paramètres $g_{A'1} = 2,076$, mT $g_{A'2} = 1,930$ mT, $g_{A'3} = 1,852$ mT. Cette modification est uniquement due à l'interaction spécifique entre la SAM et le centre $[4\text{Fe-4S}]$ radical-SAM. La composante A a donc été attribué au centre $[4\text{Fe-4S}]$ radical-SAM.

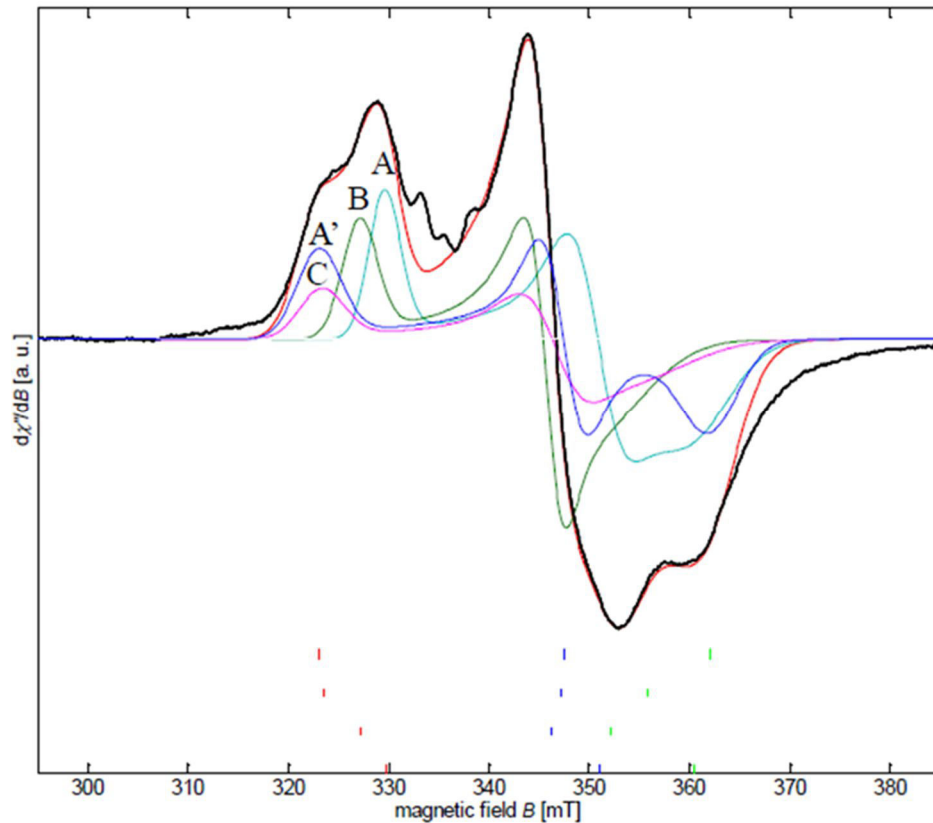


Figure 4.13 : Spectre RPE de l'holoenzyme RumMc1 (200 μ M) en présence de SAM. Les centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ ont été réduits par l'ajout de dithionite (10 mM final), puis la SAM a été ajoutée (1mM final).

Afin de confirmer l'attribution de la composante A au centre $[4\text{Fe-4S}]$ radical-SAM, un mutant radical-SAM a été produit de la même manière que holo-RumMc1. Les cystéines du motif radical-SAM ont été mutées en alanine ($\text{AX}_3\text{AX}_2\text{A}$), ne permettant donc pas la coordination du centre $[4\text{Fe-4S}]$ radical-SAM. Le spectre de ce mutant a été enregistré en présence ou en absence de SAM. La présence de SAM n'induit aucun changement dans le signal noir (Figure 4.14). Ces spectres ont pu être simulés par les deux composantes B ($g_{B1} = 2,050$ mT, $g_{B2} = 1,938$ mT, $g_{B3} = 1,911$ mT) et C ($g_{C1} = 2,073$ mT, $g_{C2} = 1,932$ mT, $g_{C3} = 1,887$ mT), permettant d'obtenir la simulation du spectre expérimental en rouge. L'interaction de la SAM avec le centre radical-SAM étant spécifique, ce mutant permet de confirmer que la composante A est celle du centre radical-SAM.

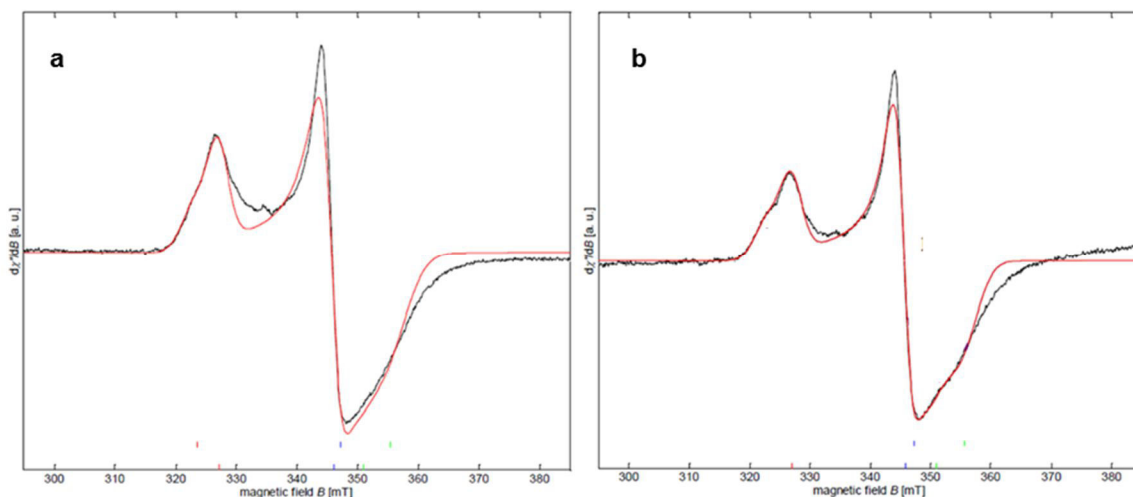


Figure 4.14 : Spectres RPE du mutant radical-SAM de RumMc1 (200 μ M) sans SAM **a** et avec **b**. Les centres $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ ont été réduits par l'ajout de dithionite (10 mM final), puis la SAM a été ajoutée (1mM final).

Les composantes B et C correspondent aux centres $[4\text{Fe-4S}]$ additionnels. Les travaux en cours visent à attribuer les composantes B et C aux centres AuxI et AuxII.

L'ensemble des résultats obtenus par les méthodes analytiques et par les spectroscopies Mössbauer et RPE permet de conclure sans ambiguïté à la présence de trois centres $[4\text{Fe-4S}]$ dans l'enzyme RumMc1, un centre $[4\text{Fe-4S}]$ radical-SAM, dont l'interaction avec la SAM a été mise en évidence par RPE, et deux centres $[4\text{Fe-4S}]$ au sein du domaine SPASM.

4.6 Discussion sur le mécanisme de maturation des sactipeptides

4.6.1 Le rôle des centres additionnels

A ce jour, le mécanisme de formation d'un pont thioéther dans les sactipeptides n'a pas été clairement élucidé. En particulier, le rôle essentiel des centres additionnels dans la formation du pont, est très discuté. Dans ce sens, deux mécanismes sont proposés où le rôle de ces centres $[\text{Fe-S}]$ diffère.

Comme nous l'avons vu, le clivage réducteur de la SAM catalysé par le centre $[4\text{Fe-4S}]$ radical-SAM, va permettre la génération du radical $\text{Ado}\bullet$. Ce radical est proposé arracher un atome d'hydrogène porté par le carbone α d'un acide aminé. Cette première étape, commune aux deux mécanismes, a été démontrée avec un test de maturation *in vitro* du peptide SkfA deutéré (précurseur de Skf), par l'enzyme SkfB. L'analyse par spectrométrie de masse a mis en évidence la production d'AdoD, résultant de la réaction du radical $\text{Ado}\bullet$ avec l'acide aminé deutéré (Bruender and Bandarian, 2016). La réaction du radical $\text{Ado}\bullet$ avec l'hydrogène porté par le carbone α d'un acide aminé partenaire a été également démontrée par l'utilisation d'un peptide SkfA portant un groupe cyclopropyl à la place de la chaîne latérale de l'acide aminé partenaire. L'abstraction de l'hydrogène du carbone α par $\text{Ado}\bullet$ entraîne la

formation d'un carbone radicalaire, ce radical est alors piégé par l'ouverture du cyclopropyl (Figure 4.14). Ce test enzymatique *in vitro*, réalisé avec un mutant de SkfB ne présentant pas de centre [Fe-S] additionnel, conduit également à l'ouverture de la fonction cyclopropyl. Ceci démontre que le centre [Fe-S] additionnel de SkfB n'intervient pas dans le clivage réducteur de la SAM et dans la formation du carbone radicalaire au niveau du précurseur peptidique (Kincannon et al., 2018).

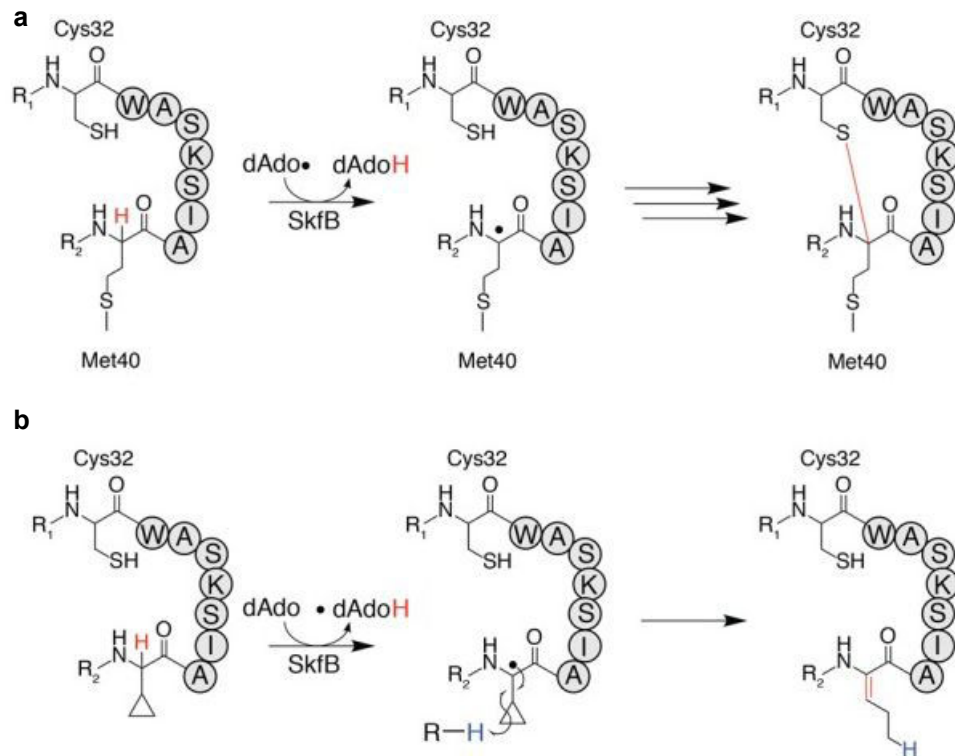


Figure 4.15 : **a** Formation du pont thioéther sur SkfA entre la cystéine 32 et le carbone α de la méthionine 40, par SkfB. **b** Ouverture du cycle cyclopropyl par SkfB, piégeant le radical sur le carbone α de la méthionine 40 (Kincannon et al., 2018).

Un rôle possible pour les centres [Fe-S] additionnels des sactisynthases a été initialement proposé par Marahiel (Figure 4.15). Ces travaux ont été menés sur la maturation de la subtilosin A par AlbA, enzyme présentant deux centres [4Fe-4S] additionnels. Nous avons vu que contrairement aux enzymes anSMe et RumMc1-2, AlbA contient uniquement sept cystéines caractéristiques au sein du domaine SPASM. Cela suppose une coordination incomplète du premier centre additionnel, laissant un fer libre. Il a été proposé que ce site de coordination vacant permette la fixation du peptide via une cystéine afin de positionner le substrat. La cystéine va ensuite réagir avec le carbone radicalaire préalablement formé aboutissant à la formation du pont thioéther (Figure 4.15). Au cours de cette réaction le premier centre [4Fe-4S] additionnel est réduit. Un électron peut alors être transféré à un

accepteur externe ou réduire le centre radical-SAM pour initier une nouvelle réaction (Flühe et al., 2012).

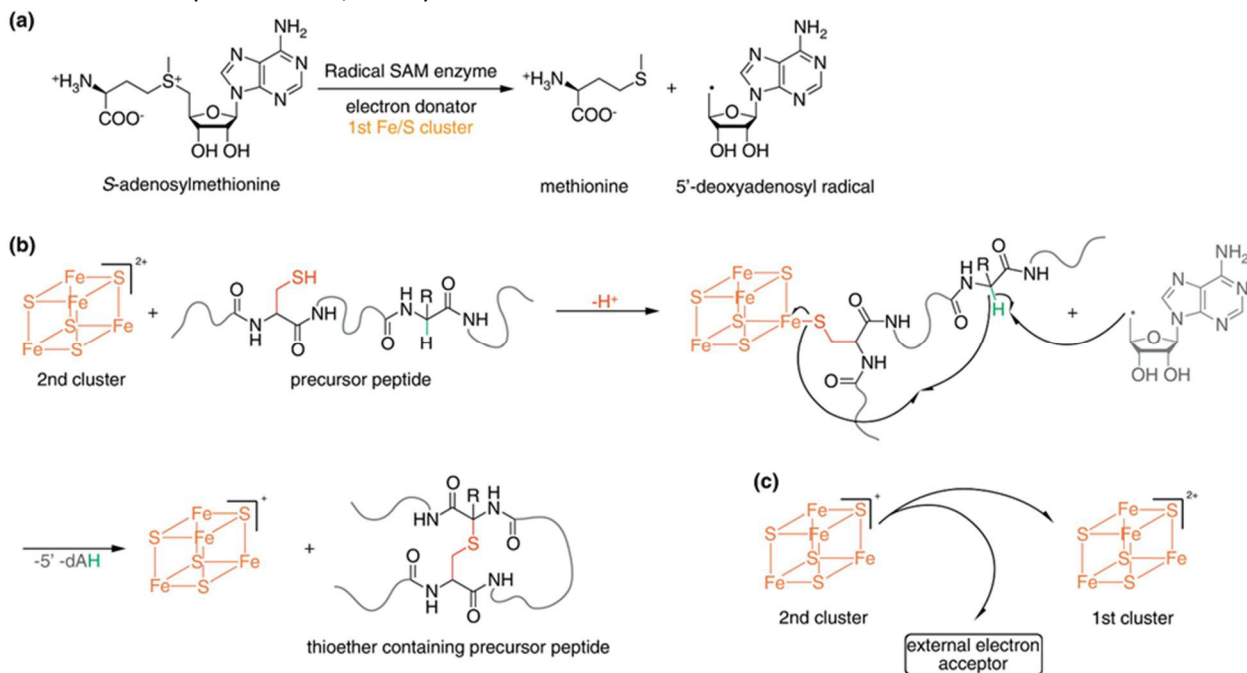


Figure 4.16 : Mécanisme proposé pour la formation des ponts thioéther chez SboA par Alba. La réduction du centre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ radical-SAM, par un réducteur externe, permet le clivage de la SAM en méthionine et radical Ado•. Ce radical permet l'abstraction d'un atome d'hydrogène sur le carbone de l'acide aminé. La formation du pont résulte de la réaction de ce carbone α radicalaire avec une cystéine du précurseur, préalablement coordonnée sur le premier centre $[4\text{Fe-4S}]$ additionnel (Flühe and Marahiel, 2013).

Un second mécanisme de formation des ponts thioéther dans les sactipeptides est proposé par l'équipe de Berteau, suite à un travail également sur Alba et la maturation de SboA. L'étude a été menée sur deux peptides modèles, SboA8-27 (allant des acides aminés 8 à 27) et SboA27-6 (peptide reliant les parties N-terminale et C-terminale du peptide par une fonction amide). Un test de maturation *in vitro* du peptide SboA27-6, a permis de mettre en évidence la formation d'un pont thioéther entre la cystéine 4 et la phénylalanine 31. Un pont retrouvé sur la subtilosin A par l'équipe de Marahiel. Au cours de ce test, un intermédiaire réactionnel N-acyliminium a été isolé, permettant de proposer un second mécanisme. Après la formation du radical sur le carbone α de Phe31, les centres $[4\text{Fe-4S}]$ additionnels favorisent la formation de l'intermédiaire N-acyliminium plus stable qu'un radical. Cet intermédiaire subit ensuite une attaque nucléophile de la cystéine aboutissant à la formation du pont thioéther (Figure 4.17) (Benjdia et al., 2016).

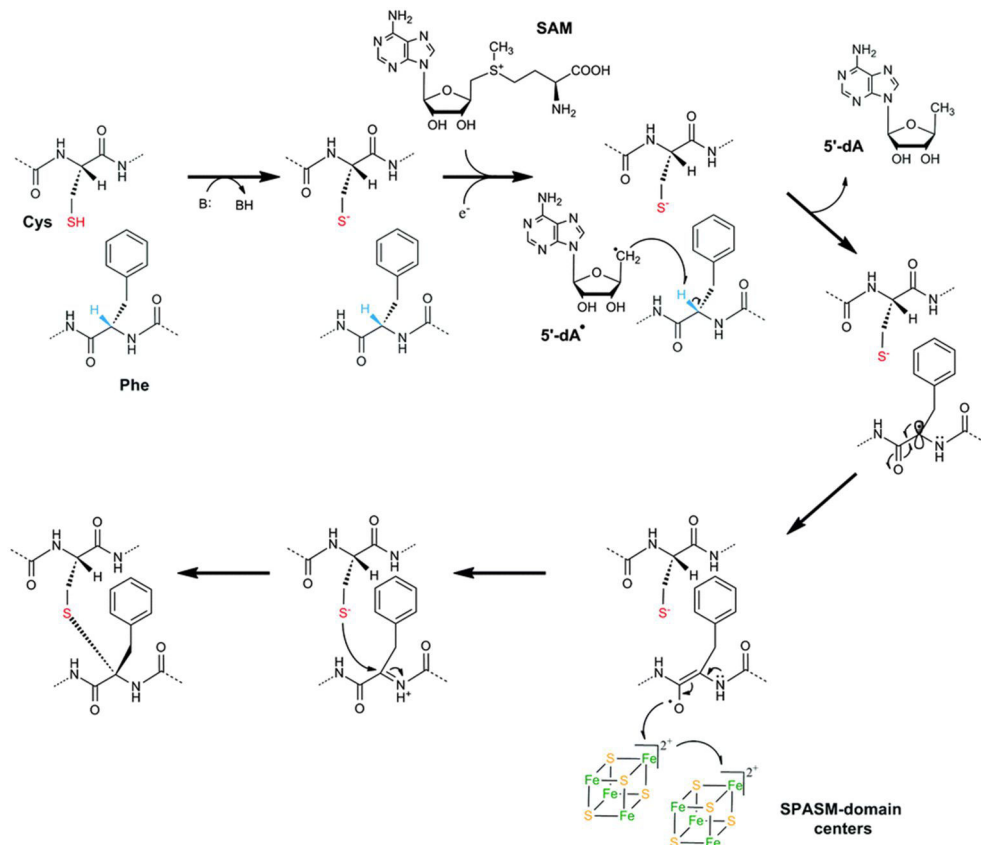


Figure 4.17 : Mécanisme proposé pour la formation des ponts thioéther chez SboA par AlbA. La réduction du centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ radical-SAM, par un réducteur externe, permet le clivage de la SAM en méthionine et radical Ado•. Ce radical permet l'abstraction d'un atome d'hydrogène sur le carbone α de l'acide aminé partenaire. Le carbone radicalaire est stabilisé en intermédiaire N-acyliminium par les centres additionnels d'AlbA jouant un rôle d'oxydant. L'attaque nucléophile de la cystéine sur ce dernier permet ensuite la formation du pont thioéther. (Benjdia et al., 2016).

Tte1186 est une enzyme radical-SAM catalysant la formation d'un pont thioéther et présente comme AlbA deux centres additionnels au sein d'un domaine SPASM. Les travaux de Bandarian sur cette enzyme ont montré par électrochimie que les trois centres $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ de l'enzyme présentent des potentiels redox différents (-490 mV pour le centre radical-SAM, -540 mV pour le centre additionnel I et -585 mV pour le centre additionnel II). La différence observée entre les trois centres $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ vient supporter l'hypothèse que les centres additionnels peuvent être utilisés pour stocker l'électron issu de l'oxydation du carbone α radicalaire (Walker et al., 2018).

Les structures d'enzymes radical-SAM présentant un domaine SPASM ne permettent pas d'identifier un motif de coordination pour les centres additionnels. La structure de CteB met en évidence que le centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ additionnel II est coordonné par les quatre cystéines 3, 4, 5 et 7 de la séquence consensus $\text{CX}_{9-15}\text{GX}_4\text{CX}_7\text{CX}_2\text{CX}_5\text{CX}_3\text{CX}_7\text{C}$, tandis que le centre additionnel I est un centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]$

coordoné par les trois cystéines restantes (1, 2 et 6) laissant un site de coordination vacant permettant la fixation de CteA (Grove et al., 2017).

Concernant SkfB, seule sactisynthase dont la structure a été élucidée, elle présente un centre additionnel unique, de type [2Fe-2S] coordonné par trois cystéines au sein d'un domaine Twitch. Ce centre fer-soufre présente lui aussi un site de coordination vacant malgré la conservation de quatre cystéines dans la partie C-terminale de SkfB. Il a été proposé que ce centre permette la fixation de SkfA par ce site de coordination (Grell et al., 2018). De façon intéressante, CteB et SkfB présentent une structure radicalement différente, que ce soit par le nombre ou le type de centres additionnels. Cependant elles catalysent la formation de ponts thioéther avec potentiellement la fixation du substrat sur un centre additionnel.

Concernant les autres enzymes à domaine SPASM, la structure d'anSMe met en évidence la coordination complète des deux centres additionnels [4Fe-4S]. Cette coordination des centres additionnels est retrouvée sur SuiB, enzyme impliquée dans la maturation de SuiA. Comme nous l'avons vu une cystéine en amont du domaine SPASM permet de coordonner complètement le centre additionnel I. PqqE, enzyme catalysant la formation d'une liaison carbone-carbone, au cours de la biosynthèse du cofacteur PQQ, présente un premier centre additionnel [2Fe-2S] complètement coordonné, et un deuxième centre [4Fe-4S] complètement coordonné (Barr et al., 2018). En regardant la seule topologie de ces enzymes, il est difficile de déterminer quelles cystéines du domaine SPASM sont impliquées dans la coordination d'un ou des centres additionnels (Figure 4.18) (Grell et al., 2018).

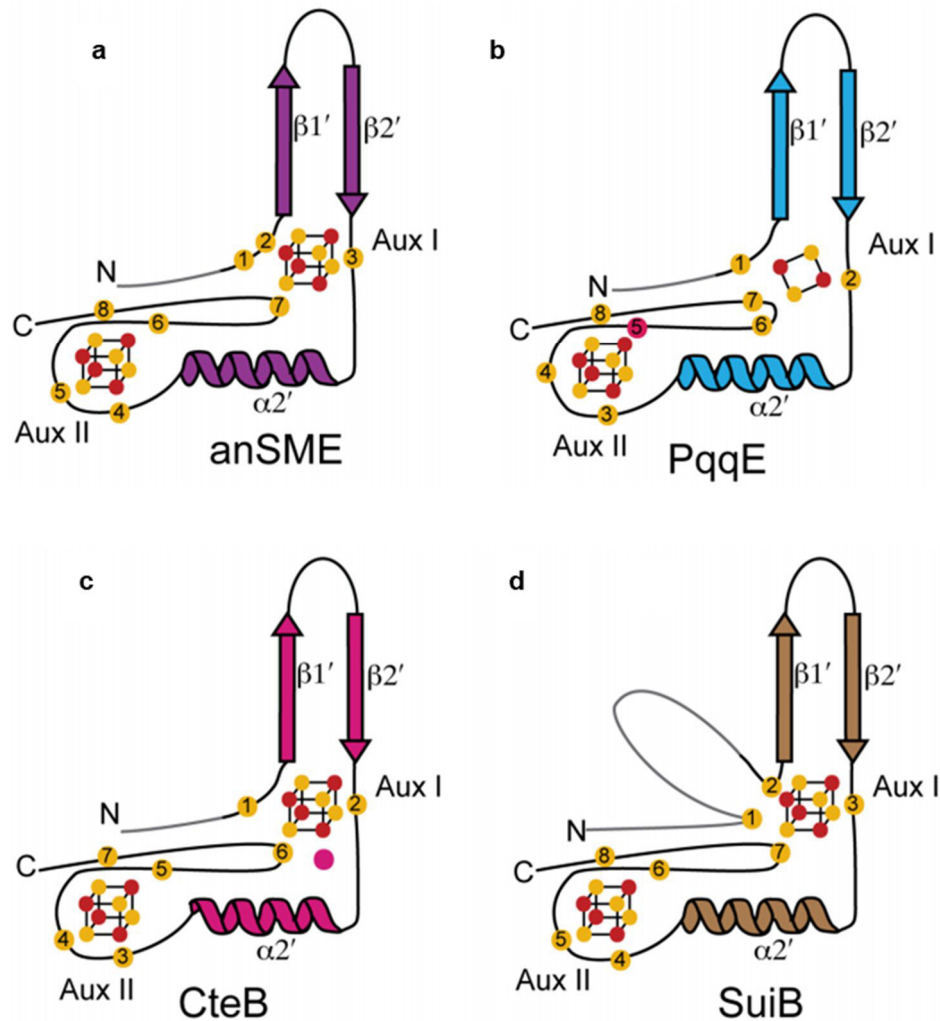


Figure 4.18 : Topologie des enzymes à domaine SPASM et cystéines impliquées dans la coordination des centres additionnels. **a** anSME. **b** PqqE. **c** CteB. **d** SuiB. (Grell et al., 2018)

4.6.2 Reconnaissance de RiPPs

Nous avons vu que l'une des hypothèses pour le rôle des centres additionnels est la fixation du peptide via une cystéine. Les structures d'enzymes radical-SAM impliquées dans la modification de peptides ont mis en évidence un motif du domaine N-terminal, impliqué dans la reconnaissance du peptide, le *RiPP precursor peptide Recognition Element* (RRE) (Burkhart et al., 2015). PqqD, enzyme chaperonne de PqqE présente le domaine RRE modèle. Ce motif est retrouvé chez SuiB en partie N-terminale (1-106). Il est constitué de trois brins β antiparallèles liés à 3 hélices formant un motif wHTH (*winged helix-turn-helix*). Il a été montré, chez NisB et LynD, qu'un tel motif permettait l'interaction de l'enzyme de maturation avec la séquence leader du peptide précurseur. Cependant la co-cristallisation de SuiB avec son précurseur SuiA a montré que ce dernier n'interagissait pas avec le domaine RRE, mais directement avec le domaine radical-SAM (Davis et al., 2017).

4.6.3 Perspectives de l'étude de RumMc1

Les deux mécanismes pour la formation des liaisons thioéther proposés dans la littérature divergent sur l'interaction ou non du peptide via une cystéine sur un centre fer-soufre additionnel. L'analyse par spectroscopie RPE de RumMc1 a mis en évidence un changement du signal expérimental lorsqu'elle est incubée avec la SAM (coordination sur le centre [4Fe-4S] radical-SAM). Nous avons donc décidé d'incuber RumMc1 et des mutants de RumMc1 ne présentant pas les centres additionnels avec le peptide RumC1. Pour obtenir les mutants de RumMc1 ne présentant pas de centres additionnels nous avons décidé de muter les deux premières cystéines (C384A, C393A), toujours impliquées dans la coordination du premier centre additionnel, chez les enzymes radical-SAM à domaine SPASM, et les cystéines quatre et cinq impliquées dans la coordination du deuxième centre additionnel (C448A, C451A). L'étude RPE sur ces mutants devrait permettre dans un premier temps de différencier les deux centres [4Fe-4S] additionnels de RumMc1, mais aussi de confirmer le rôle de ces centres additionnels dans la fixation de RumC1.

D'autre part, la présence d'un domaine RRE dans des enzymes radical-SAM à domaine SPASM interroge sur la reconnaissance du substrat par son enzyme. Concernant les sactipeptides, les peptides précurseurs sont-ils reconnus par un domaine spécifique de l'enzyme, ou par la fixation du substrat sur un centre additionnel par l'intermédiaire d'une cystéine ? Pour apporter des éléments de réponse à ces questions nous avons mis en place une collaboration avec le groupe de Marc Fontecave au Collège de France à Paris dans le but de résoudre la structure de RumMc1 en présence de son substrat par cristallographie des rayons X. Ces travaux combinés aux études par spectroscopie RPE de différents mutants des centres [4Fe-4S] additionnels de RumMc1 en présence de RumC1 visent à démontrer l'interaction du peptide avec les centres [4Fe-4S] additionnels du domaine SPASM.

La caractérisation biophysique de RumMc1 nous a permis de confirmer que cette enzyme appartient à la famille des enzymes radical-SAM à domaine SPASM. Bien que leur rôle ne soit pas élucidé, les centres [Fe-S] additionnels sont essentiels à l'activité de l'enzyme. Au cours du chapitre suivant, nous allons étudier l'activité de RumMc1, et en particulier nous intéresser aux modifications post-traductionnelles induites sur RumC1.

Chapitre 5 : Production hétérologue de la bactériocine RumC1

Nous avons vu précédemment qu'il est possible d'obtenir l'enzyme RumMc1 avec ses trois centres [4Fe-4S], par deux voies différentes. Nous allons nous focaliser au cours de ce chapitre sur la maturation de RumC1 par RumMc1, et en particulier sur l'identification des modifications post-traductionnelles introduites afin de vérifier que les bactériocines RumC sont des sactipeptides.

Pour cela un système d'expression hétérologue permettant de produire la bactériocine maturée (mRumC1) a été mis en place au sein d'une souche d'*E. coli*. L'analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier la nature et la position des modifications. Une campagne de mutagenèse dirigée sur RumC1 associée à une étude par RMN a complété la caractérisation biochimique et structurale de RumC1. Nous avons par ailleurs étudié le rôle du peptide leader de RumC1 au travers d'un test enzymatique de maturation de RumC1 par RumMc1.

5.1 Expression hétérologue de nRumC1

Un des buts des systèmes d'expression hétérologues de RiPPs est d'exprimer les peptides modifiés en grande quantité. Le premier exemple, publié en 2004, concerne la production du lanthipeptide nukacin ISK-1 produit originellement par *Staphylococcus warneri* ISK-1. Une souche de *L. lactis* a été transformée par un plasmide portant l'opéron responsable de la biosynthèse de ce peptide antimicrobien. Après culture de cette souche recombinante et induction de l'opéron, il a été montré qu'elle présentait une activité antimicrobienne contre *Piedococcus pentosaceus*. L'analyse par spectrométrie de masse a montré que la nukacin ISK-1 était maturée (Aso et al., 2004). Ce premier système d'expression hétérologue a mis en avant un nouveau moyen de production et d'étude des RiPPs. Des systèmes ont par la suite été développés pour d'autres classes de RiPPs. On peut citer par exemple l'expression hétérologue de la kocurin par *Streptomyces coelicolor* M1146, un thiopeptide actif contre *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA pour *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*). L'opéron responsable de la biosynthèse de la kocurin a été entièrement cloné dans un plasmide, permettant ainsi la production de la bactériocine maturée (Linares-Otoya et al., 2017). Un autre exemple est le système d'expression hétérologue des peptides lassos d'*Actinobacteria* marine avec différentes souches de *Streptomyces* (Mevaere et al., 2018).

Dans le cas des sactipeptides un seul système d'expression hétérologue a été développé, celui de la subtilosin A chez *E. coli*. Le gène *sboA*, précurseur de la subtilosin A et le gène *albA*, encodant l'enzyme radical-SAM AlbA, ont été clonés au sein du même plasmide. Après culture d'une souche d'*E. coli* transformée par ce plasmide, la subtilosin A modifiée a été purifiée par chromatographie d'affinité. L'analyse par spectrométrie de masse, a confirmé la présence de trois ponts thioéther sur la subtilosin A. L'application de ce système à différents mutants de la subtilosinA a permis de proposer un ordre dans la formation des ponts thioéther au cours de la biosynthèse (Himes et al., 2016). Ces résultats seront discutés ultérieurement dans ce mémoire.

Un avantage des systèmes d'expression hétérologues est l'utilisation de souches avec lesquelles il est plus facile de travailler que la souche productrice d'origine (Kuthning et al., 2015). Prenons par exemple le cas des bactériocines RumC produites par *R. gnavus* E1, une bactérie anaérobie stricte. L'utilisation d'une autre souche telle qu'*E. coli* permet une production plus aisée de ces bactériocines. Il est à noter qu'il existe aussi des systèmes d'expression homologue, par exemple celui de la thurincin H, où la transformation de la souche *B. thuringiensis*, déficiente pour la production de la bactériocine, par des plasmides portant les gènes responsables de la biosynthèse, restaure la production de ce sactipeptide (Wang et al., 2014a).

Pour mettre au point un tel système d'expression avec RumC, nous avons d'abord vérifié la possibilité de produire la bactériocine RumC1 dans son état natif non mûré, que l'on notera nRumC1.

5.1.1 Production et purification de nRumC1

La surexpression hétérologue de nRumC1 est faite dans une souche d'*E. coli* BL21(DE3), transformée par le plasmide pETM-40-*rumC1*, cultivée en milieu minimum M9. La surproduction de la protéine est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM) lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,8. La culture est ensuite poursuivie 15 h à 25 °C. L'utilisation du plasmide pETM-40 permet de produire nRumC1 sous forme de protéine fusion, avec en N-terminal une étiquette MBP (*Maltose Binding Protein*) clivable par la protéase TEV (*Tobacco Etch Virus*). L'expression de nRumC1 avec une simple queue de six histidines a été tentée, cependant la surexpression de nRumC1 n'a jamais été observée, ce qui suggère la nécessité d'avoir une étiquette structurée à l'extrémité N-terminale pour éviter la dégradation du peptide.

L'ensemble du protocole de purification de la bactériocine est réalisé en milieu aérobie. La lyse des cellules se fait par sonication et l'extrait soluble, contenant MBP-nRumC1 sont obtenus par ultracentrifugation. Pour purifier MBP-nRumC1 on réalise dans un premier temps une chromatographie d'affinité sur résine amylose (colonne MBPTrap) permettant de récupérer la protéine fusion MBP-nRumC1 après élution au maltose (Figure 5.1 **a**). Cependant au cours de la phase de lavage, il est à noter qu'une partie de la protéine MBP-nRumC1 se détache de la colonne avant l'élution (Figure 5.1 **a**). Le gel SDS-PAGE montre une bande correspondant à la fusion MBP-nRumC1 aux alentours de 50 kDa correspondant à la masse attendue de 49 672 Da. La deuxième bande de poids moléculaire inférieur correspond à la MBP seule, résultant d'un clivage entre MBP et nRumC1 (Figure 5.1 **b**). Les fractions contenant la protéine fusion d'intérêt, sont regroupées, concentrées et dosées en UV (Figure 5.1 **c**).

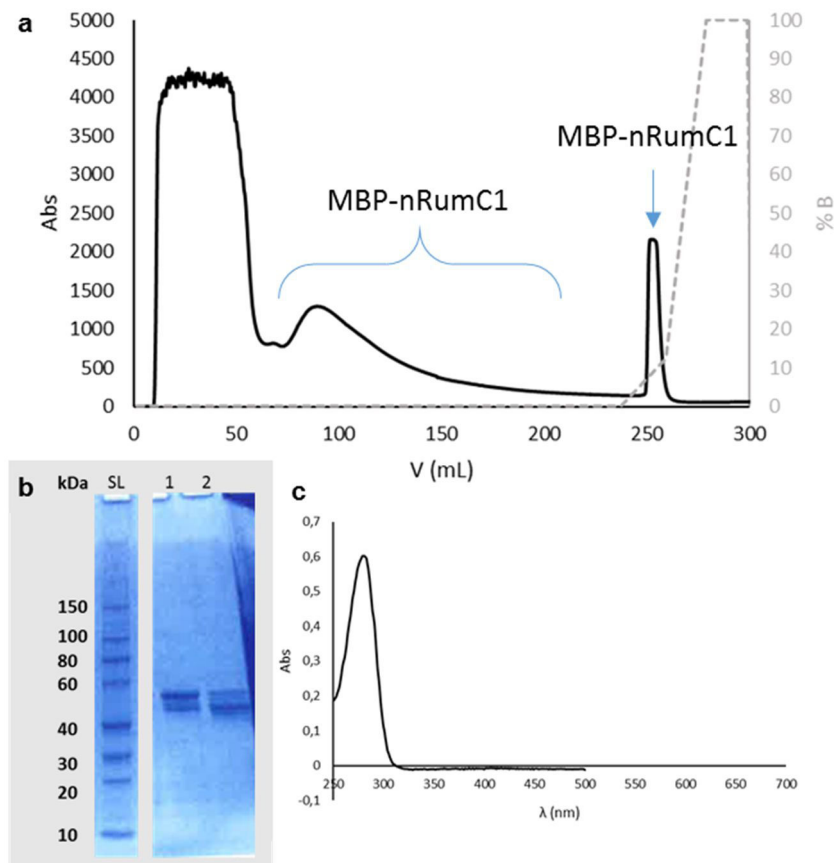


Figure 5.1 : Purification de MBP-nRumC1. **a** Profil d'élution de nRumC1 sur colonne MBPTrap. **b** Gel SDS-PAGE des fractions contenant nRumC1. SL : Echelle de poids moléculaires, 1 : Fraction contenant MBP-nRumC1 pendant la phase de lavage. 2 : Pic élué correspondant à MBP-nRumC1. **c** Spectre UV-Visible de la protéine fusion MBP-nRumC1.

Afin de séparer l'étiquette MBP de nRumC1 un clivage à la protéase TEV est réalisé sur l'échantillon concentré. La protéine nRumC1 est ensuite isolée de la TEV et de la MBP par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne SuperdexS75 (chromatographie d'exclusion, pour des protéines allant de 3 kDa à 70 kDa) (Figure 5.2 **a**). Le gel SDS-PAGE montre des traces de MBP dans l'échantillon nRumC1 (Figure 5.2 **b**). Une deuxième injection est réalisée dans le but de l'éliminer (Figure 5.2 **a**). La pureté de la protéine est évaluée par gel SDS-PAGE. Une bande est observée aux alentours de 10 kDa, légèrement plus haute que la masse attendue de 6 723 Da pour nRumC1. (Figure 5.2 **b**). Les fractions contenant la protéine surexprimée, sont regroupées, concentrées et dosées en UV (Figure 5.2 **c**). Une bande d'absorption inexpliquée à 320 nm est observée sur le spectre UV-visible.

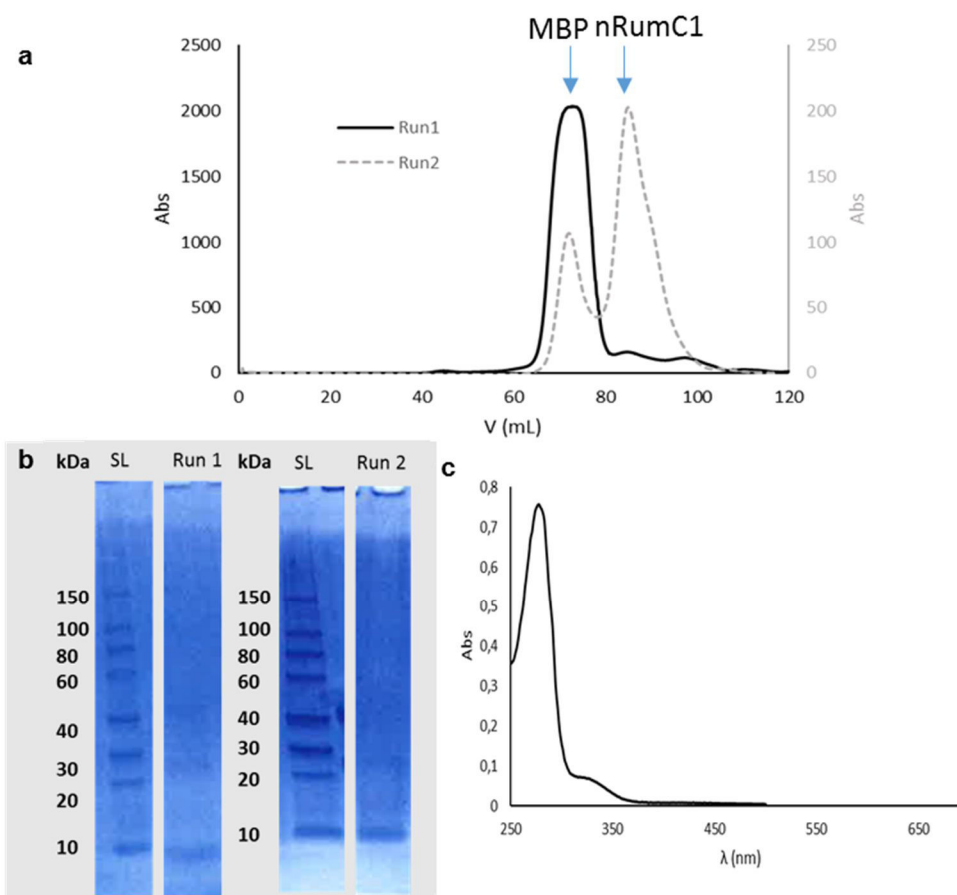


Figure 5.2 : Purification de nRumC1. **a** Profil d'élution de nRumC1 sur colonne SuperdexS75. **b** Gels SDS-PAGE de la purification de nRumC1. SL : Echelle de poids moléculaires, Run1 : Première injection sur Superdex S75, Run2 : Deuxième injection sur Superdex S75. **c** Spectre UV-visible de nRumC1.

L'analyse par spectrométrie de masse confirme que ce système d'expression chez *E. coli* permet de produire le peptide nRumC1. Le rendement correct de ce protocole d'expression, de l'ordre de 2 mg/L de culture nous permet d'envisager d'utiliser un tel système d'expression hétérologue pour maturer nRumC1 *in vitro*.

5.2 Maturation hétérologue de nRumC1 par RumMc1

Nous avons opté pour l'expression hétérologue et la maturation de nRumC1 avec trois plasmides : le premier plasmide pETM-40-*rumC1* est utilisé pour la production de nRumC1, le second plasmide pET-15b-*rumMc1*, portant le gène *rumMc1* codant pour l'enzyme de maturation et le dernier plasmide PACYCDuet-1-suf permet l'expression des protéines Suf d'assemblage des centres [Fe-S] nécessaire à l'activité de RumMc1. Afin de favoriser la triple transformation et obtenir une souche d'*E. coli* avec les trois plasmides nous avons optimisé les concentrations de plasmides et d'antibiotiques, la durée du choc thermique à 42 °C ainsi que le temps d'incubation à 37 °C avant d'étaler les bactéries sur LB Agar.

5.2.1 Production et purification de mRumC1

La culture cellulaire se fait en milieu minimum M9 en présence de 50 μM de FeCl_3 . La surproduction de protéines est induite par l'ajout de 1 mM d'IPTG lorsque la densité optique à 600 nm atteint 0,8. A ce stade, le milieu est complété à 300 μM de L-cystéine et 100 μM de FeCl_3 . La culture est ensuite poursuivie pendant 15 h à 25 °C.

Le protocole de purification, identique à celui que nous avons décrit pour nRumC1, conduit ici à la forme maturée que nous noterons mRumC1. Le chromatogramme présenté Figure 5.3 **a** montre l'élution de la protéine fusion MBP-mRumC1 sur colonne MBPTrap en présence de maltose. Les fractions d'intérêt sont identifiées par gel SDS-PAGE. La bande correspondant à MBP-mRumC1 est obtenue aux alentours de 50 kDa ce qui est en accord avec la masse attendue de 49 672 Da. Comme dans le cas de MBP-nRumC1, nous observons une bande correspondant à la MBP seule (Figure 5.3 **b**). Les fractions contenant la protéine MBP-mRumC1 sont concentrées et dosées en UV (Figure 5.3 **c**).

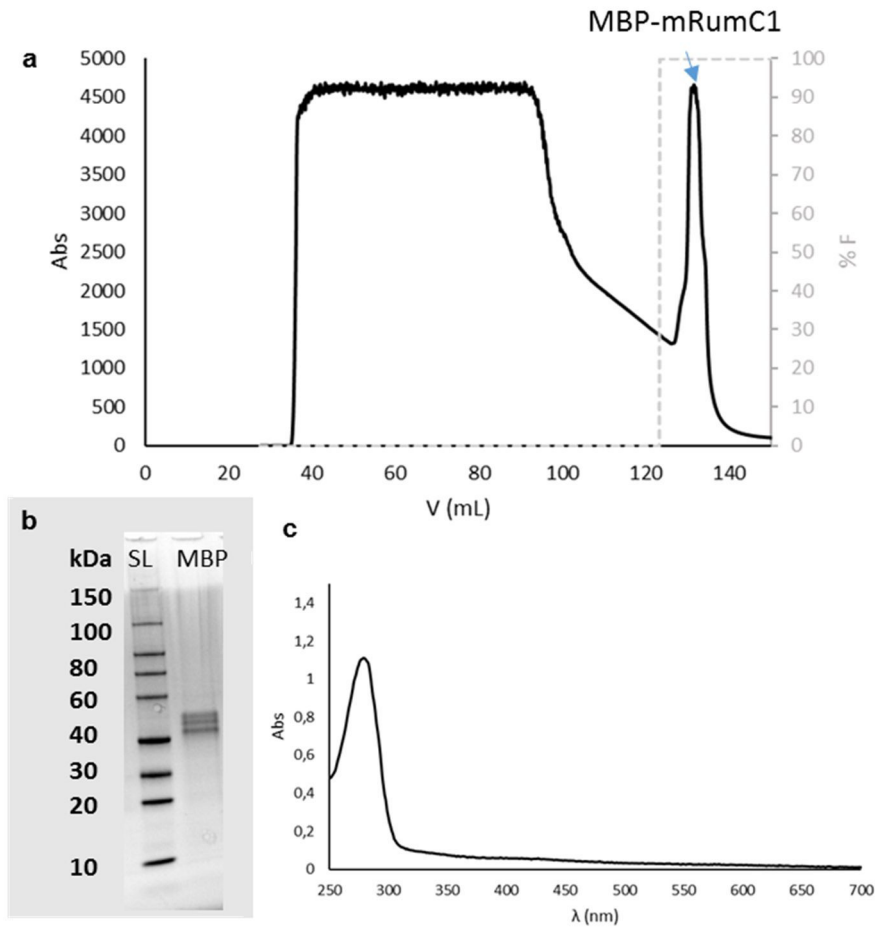


Figure 5.3 : Purification de MBP-mRumC1. **a** Profil d'éluion de MBP-mRumC1 sur colonne MBPTrap. **b** Gel SDS-PAGE des fractions contenant MBP-mRumC1. SL : Echelle de poids moléculaires, MBP : Pic élué correspondant à MBP-mRumC1. Révélation faite par la fluorescence du tryptophane **c** Spectre UV-visible de la protéine fusion MBP-mRumC1.

La protéine fusion MBP-mRumC1 est digérée à la protéase TEV puis purifiée par chromatographie d'exclusion afin d'obtenir mRumC1 (Figure 5.4 **a**). Le degré de pureté de mRumC1 est évalué par gel SDS-PAGE (Figure 5.4 **b**). Les fractions d'intérêt sont concentrées et dosées en UV (Figure 5.4 **c**). Ce protocole permet d'obtenir entre 2 et 3 mg de mRumC1 par litre de culture.

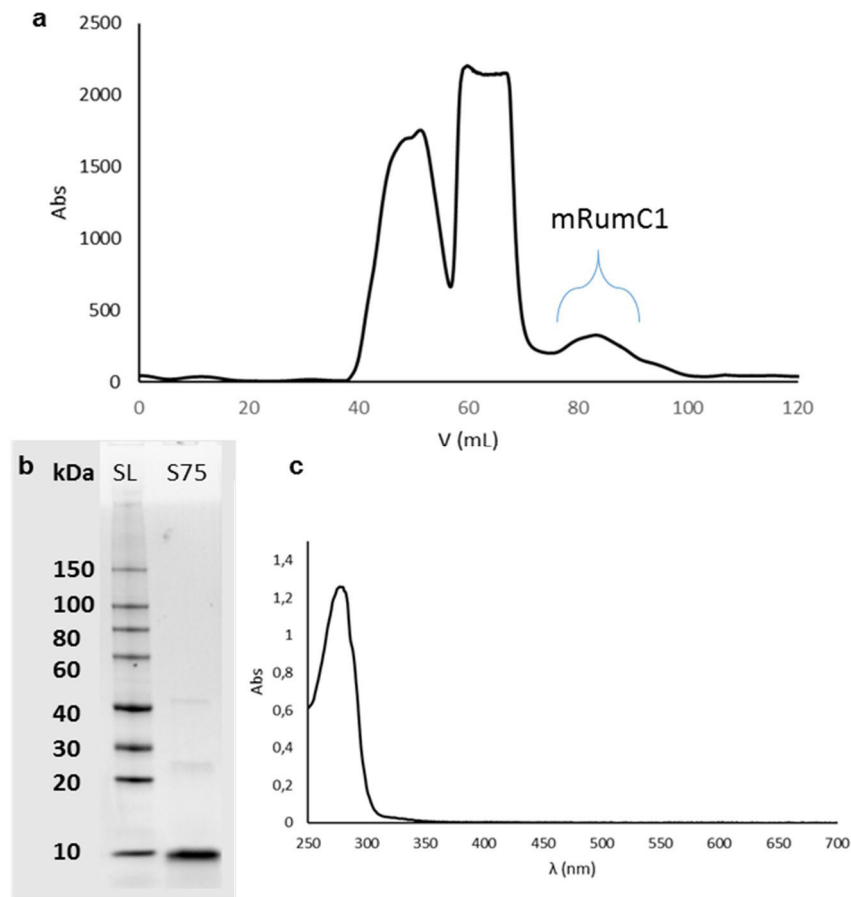


Figure 5.4 : Purification de mRumC1. **a** Profil d'élution de mRumC1 sur colonne SuperdexS75. **b** Gel SDS-PAGE de la purification de mRumC1. SL : Echelle de poids moléculaires, S75 : Pic d'élution de mRumC1. Révélation faite par la fluorescence du tryptophane **c** Spectre UV-visible de la construction mRumC1.

5.3 Caractérisation biochimique et structurale de mRumC1

5.3.1 Dichroïsme circulaire en UV lointain

Le dichroïsme circulaire est une technique donnant des informations sur les structures secondaires des protéines. En effet, suivant les structures, en hélice- α , en feuillet- β ou désordonnées, les protéines présentent un dichroïsme circulaire spécifique. Ici nous avons comparé les spectres de nRumC1 et mRumC1. Le spectre de nRumC1 présente une bande d'absorption aux alentours 200 nm caractéristique d'une structure désordonnée. Le spectre de mRumC1 quant à lui présente deux bandes d'absorption à 210 et 220 nm caractéristiques des hélices α (Figure 5.5).

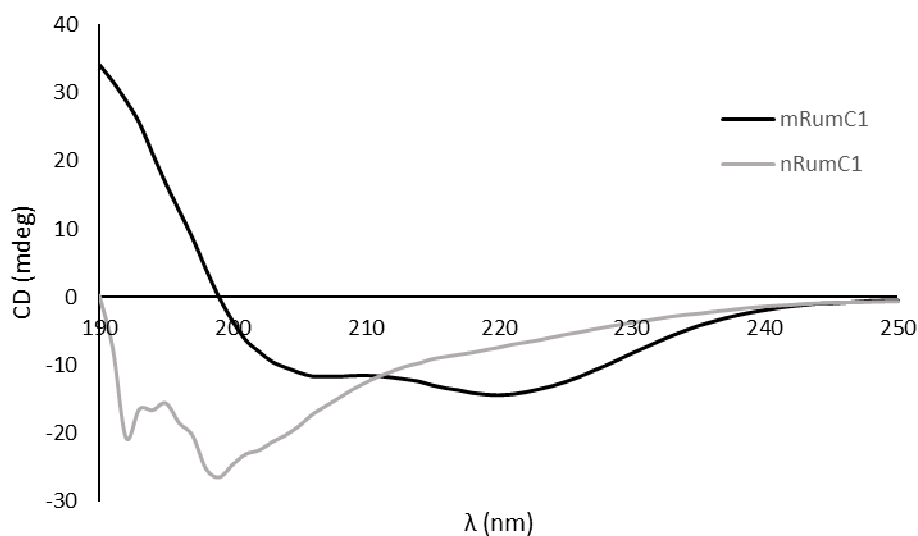


Figure 5.5 : Dichroïsme circulaire de nRumC1 (gris) et mRumC1 (noir).

5.3.2 Analyse du peptide mRumC1 par spectrométrie de masse

Le but de l'étude par spectrométrie de masse est, dans un premier temps de confirmer que mRumC1 est un sactipeptide et dans un deuxième temps d'identifier le ou les résidus impliqués dans les modifications chimiques. La masse observée pour le peptide mRumC1 est de 6711,08 Da soit une différence de -8 Da par rapport à celle de nRumC1 à 6719,10 Da, en accord avec la masse monoisotopique théorique (Figure 5.6 **a**) (Chiumento et al., 2019). La Figure 5.6 **b** montre que la formation d'un pont thioéther dans les sactipeptides entraîne la perte d'un atome d'hydrogène sur le carbone α d'un acide aminé et la perte d'un proton sur une cystéine soit une perte de 2 Da en masse. RumC1 présentant quatre cystéines (C3, C5, C22, C26) nous pouvons nous attendre à une perte de masse de 2, 4, 6 ou 8 Da selon le nombre de cystéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles. Une perte de 8 Da suggère que les quatre cystéines de mRumC1 forment des liaisons thioéther.

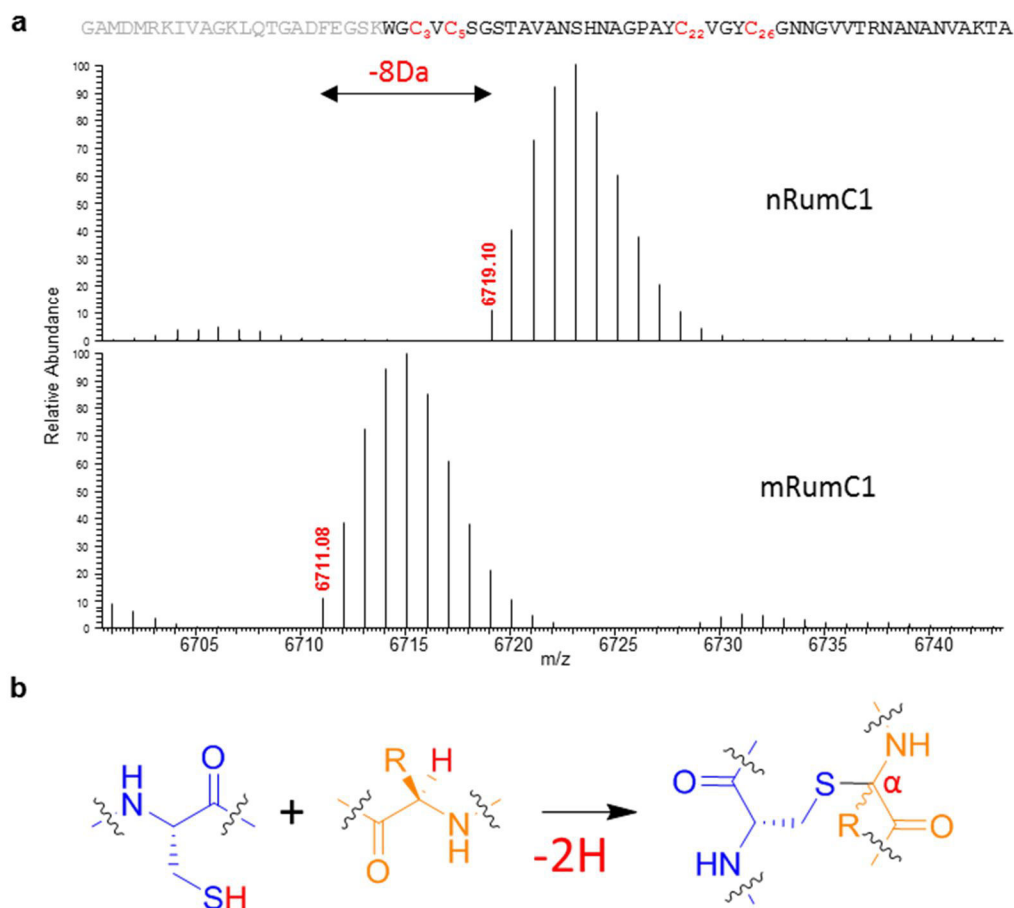


Figure 5.6 : Analyse par spectrométrie de masse de nRumC1 et mRumC1. **a** Séquence de nRumC1, les cystéines sont indiquées en rouge. Spectres de masse déconvolués de nRumC1 et mRumC1. **b**. Formation d'un pont thioéther dans les sactipeptides.

5.3.3 Alkylation des cystéines de mRumC1

Afin de vérifier si les quatre cystéines de mRumC1 sont impliquées dans des ponts thioéther, un test d'alkylation à l'iodoacétamide a été réalisé sur nRumC1 et mRumC1. En réagissant avec la cystéine, l'iodoacétamide engendre une augmentation de 57 Da (Figure 5.7 **a**). Lorsque ce test est réalisé avec nRumC1, il y a une augmentation de 228 Da de la masse totale, ce qui correspond à l'alkylation des quatre cystéines (Figure 5.7 **b**). Concernant mRumC1, le test d'alkylation n'engendre aucun changement en masse, ce qui montre clairement que les quatre cystéines de mRumC1 ne sont pas accessibles et donc probablement impliquées dans des liaisons thioéther (Figure 5.7 **c**) (Chiumento et al., 2019).

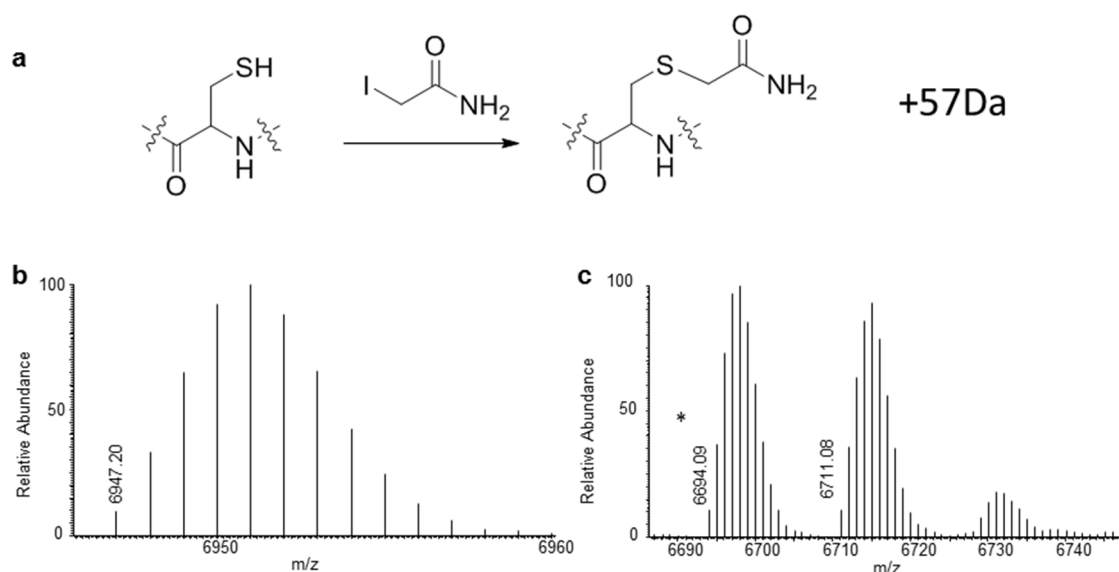


Figure 5.7 : Test d'alkylation des cystéines. **a** Réaction d'alkylation d'une cystéine par l'iodoacétamide. **b** Spectre de masse déconvolué de nRumC1 après alkylation. **c** Spectre de masse déconvolué de mRumC1 après alkylation. La masse à 6694,09 Da correspond à une forme succinimide, au niveau de la séquence NG, due au chauffage de l'échantillon pendant le test d'alkylation (adaptée de Chiumento *et al.*, 2019).

5.3.4 Spectrométrie de masse en tandem MS/MS

Nous venons de voir que nRumC1 est modifié par l'enzyme RumMc1 et que les quatre cystéines sont impliquées dans des ponts thioéther. Cependant pour identifier les acides aminés partenaires des cystéines, mRumC1 a été analysé par spectrométrie de masse en tandem. Contrairement aux ponts thioéther des lanthipeptides, les ponts thioéther des sactipeptides s'ouvrent au cours de la fragmentation MS/MS. Cette ouverture conduit à la cystéine non modifiée et à la forme déshydrogénée de l'acide aminé partenaire, avec une perte de masse de 2 Da (Figure 5.8 **a**) (Lohans and Vederas, 2014). Le spectre obtenu par spectrométrie de masse en tandem à haute énergie de collision montre que les résidus alanine 12, asparagine 16, arginine 34 et la lysine 42 (A12, N16, R34, K42) présentent ce défaut de masse (Figure 5.8 **b**). Ce résultat suggère que ces acides aminés sont les partenaires des quatre cystéines de mRumC1. L'ensemble de ces données confirme que mRumC1 est un sactipeptide présentant quatre ponts thioéther (Chiumento *et al.*, 2019).

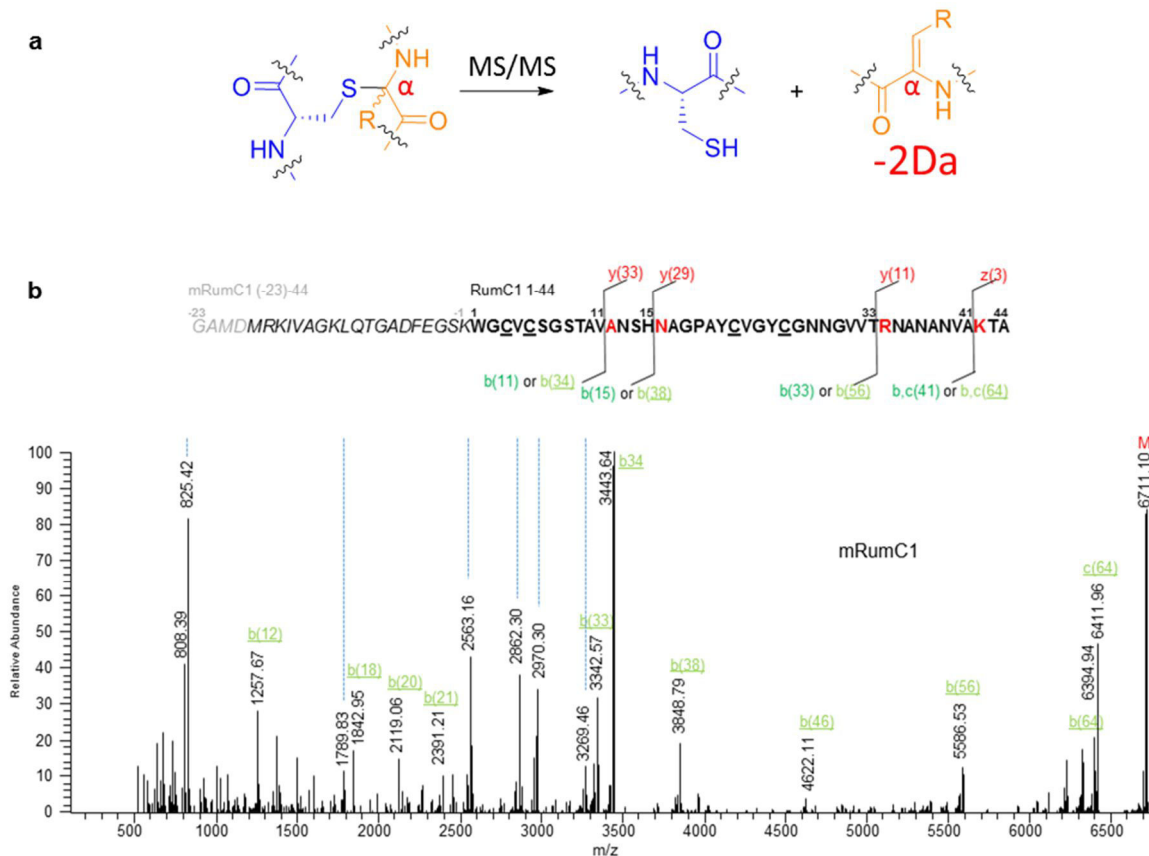


Figure 5.8 : **a** Ouverture des ponts thioéther des sactipeptides pendant une analyse MS/MS. **b** Spectre MS/MS déconvolué pour mRumC1 (le peptide leader est en italique et les résidus GAMD en gris ont été rajoutés pour des besoins de clonage). La numérotation des acides aminés est indiquée au-dessus de la séquence. La position 1 est attribuée au résidu W juste après la séquence leader. Les masses inférieures à 500 Da ne sont pas montrées. Les masses indiquées sont monoisotopiques. M correspond au peptide non fragmenté (adaptée de Chiumento *et al.*, 2019).

5.3.5 Mutagenèse dirigée sur mRumC1

La spectrométrie de masse en tandem a permis d'identifier les résidus impliqués dans les quatre ponts thioéther de mRumC1. Cependant cette technique ne permet pas de relier une cystéine à un partenaire en particulier. Il est intéressant de noter que lors de l'analyse en spectrométrie de masse, les fragments G(-23)-Y21 et A17-A44 sont détectés avec une perte de masse de 4 Da. Ce résultat indique la formation de deux ponts thioéther dans la partie N-terminale impliquant les résidus C3, C5, A12 et N16 et deux autres ponts dans la partie C-terminale avec les acides aminés C22, C26, R34 et K42. Nous avons réalisé des expériences de mutagenèse dirigée sur mRumC1 afin d'identifier clairement les liaisons thioéther. Pour cela nous avons opté pour la mutation des cystéines. En effet les travaux de Bowers sur la subtilosin A ont montré que la mutation des acides aminés partenaires n'empêchait pas la formation des liaisons thioéther. Dans la majorité des mutants, les auteurs ont détecté des ponts thioéther avec l'acide aminé introduit (Himes *et al.*, 2016). A

l'instar de mRumC1, les mutants RumC1-C3A, RumC1-C5A, RumC1-C22A et RumC1-C26A ont été exprimés et maturés de façon hétérologue chez *E. coli*.

Afin de détecter de potentielles cystéines libres, les mutants ont été soumis au test d'alkylation puis analysés en spectrométrie de masse MS/MS. Le premier résultat important est que chaque mutant génère un mélange peptidique complexe, présentant une ou plusieurs cystéines alkylées (Figure 5.9). Ce résultat suggère que pendant la maturation de mRumC1, la formation d'un pont thioéther influence la formation des trois autres ponts. En d'autres termes, que la formation des ponts suit un ordre précis. Cette propriété, déjà mise en évidence par les travaux de Bowers, a permis de proposer que la formation des ponts thioéther de la subtilosin A se fait en commençant par l'extrémité N-terminale de la bactériocine en direction de la partie C-terminale (Himes et al., 2016).

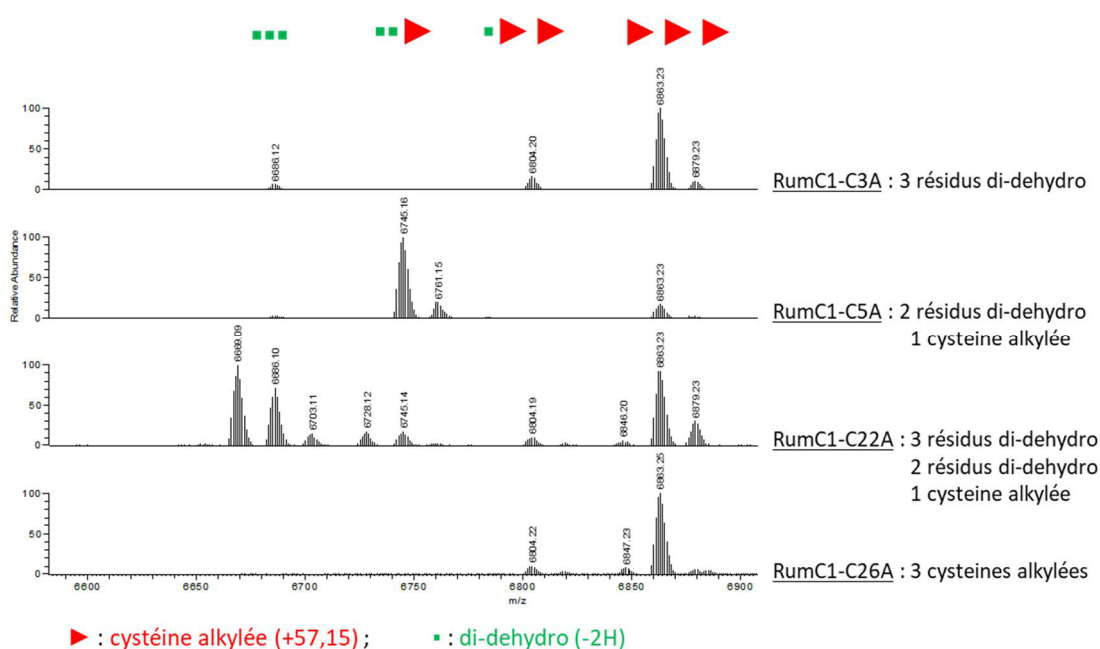
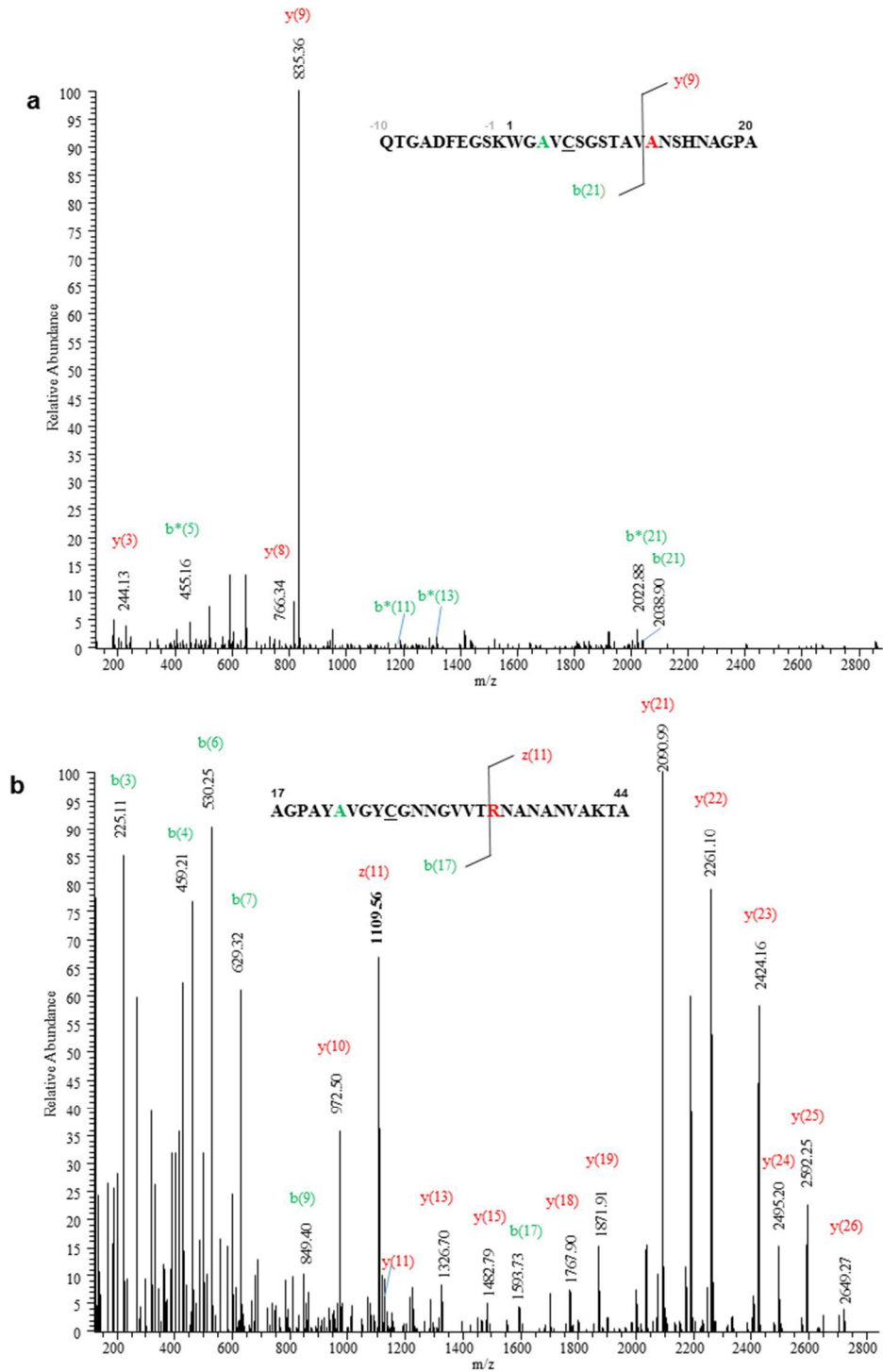


Figure 5.9 : Spectres de masses déconvolués des différents mutants. Ici chaque mutant de mRumC1 génère différentes populations de peptides.

Cependant, des informations intéressantes peuvent être tirées à partir de la fragmentation d'un peptide présent dans un mélange. Nous avons donc concentré notre étude sur les résidus identifiés comme partenaires des quatre cystéines et dont la masse est soit non modifiée, soit présente une perte de 2 Da lors de la mutation d'une seule cystéine. L'analyse MS/MS du peptide Q(-10)-A20 observé pour le mutant mRumC1-C3A n'a montré aucune perte de masse sur le résidu N16 mais une perte de 2 Da sur A12. Ces données indiquent qu'un pont thioéther se forme entre C5 et A12, et que le partenaire de C3 est N16. En effet, le peptide F(-5)-A20 du mutant mRumC1-C5A contient un résidu A12 non modifié. Dans le cas du mutant mRumC1-C22A, la fragmentation du peptide A17-A44 a révélé un déficit de 2 Da pour R34 alors que K42 n'est pas modifié. Ces observations suggèrent que R34 et K42 sont les partenaires de C26 et C22, respectivement (Figure 5.10) (Chiumento et al., 2019).



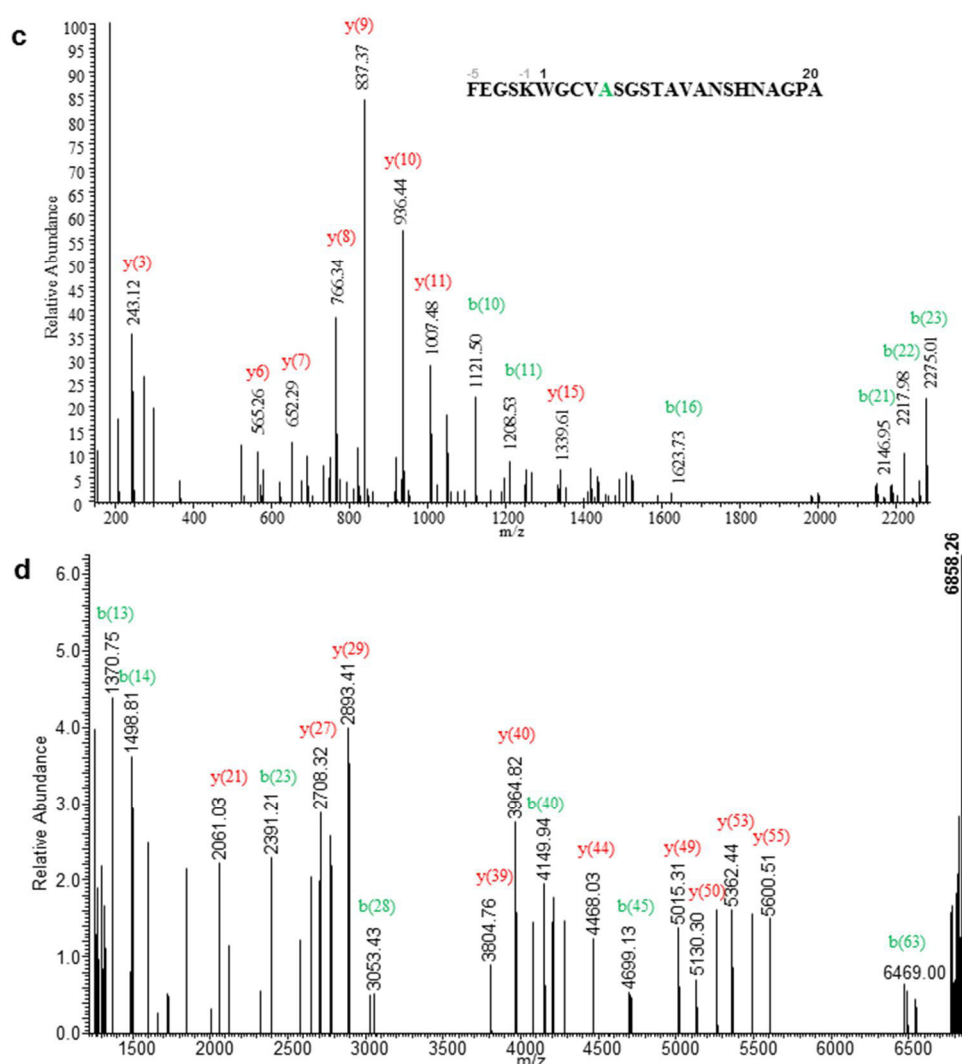


Figure 5.10 : Analyse par spectrométrie de masse en tandem des mutants de mRumC1. **a** Spectre MS/MS du fragment Q(-10)-A20 du mutant mRumC1-C3A. Présence d'un unique pont thioéther entre C5 et A12. Le fragment intense y9 indique un pont thioéther impliquant A12. **b** Spectre MS/MS du fragment A17-A44 du mutant mRumC1-C22A. Présence d'un unique pont thioéther entre C26 et R34. Les ions b17 et z11 indiquent la présence d'un pont thioéther impliquant R34. **c** Spectre MS/MS du fragment F(-5)-A20 du mutant mRumC1-C5A révélant l'alkylation de C3. **d** Spectre MS/MS de mRumC1-C26A montrant l'alkylation des 3 cystéines. (b* correspond à un ion b avec une perte de NH₃ due à la présence de Q) (adaptée de Chiumento *et al.*, 2019).

L'ensemble de ces données nous permet de proposer un modèle structural, dans lequel mRumC1 est organisé en deux domaines, présentant deux ponts thioéther chacun. Ces deux domaines sont séparés par le motif conservé AGPAY conférant au peptide mûré une structure globale en double épingle (Figure 5.11).

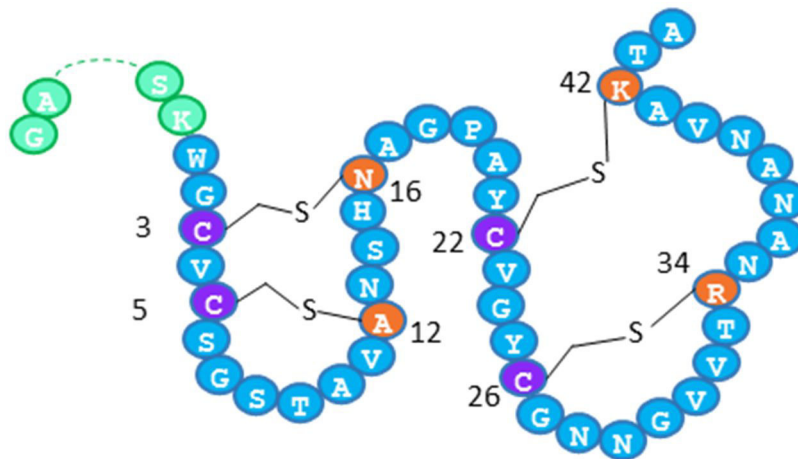


Figure 5.11 : Structure en double épingle à cheveux de RumC1. Les cystéines impliquées dans les ponts sont en violet et les acides aminés partenaires en orange (Chiumento et al., 2019).

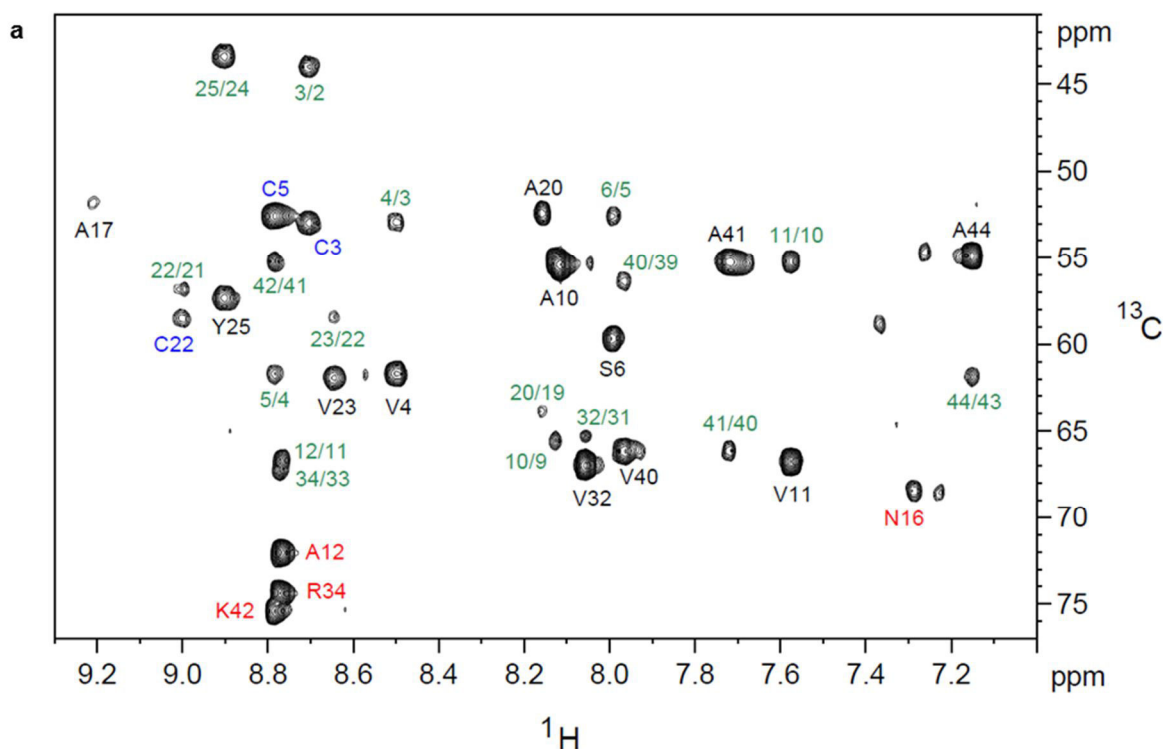
Les sactipeptides présentant plusieurs ponts thioéther adoptent une structure globale en épingle dans laquelle les cystéines de l'extrémité N-terminale relient les partenaires situés dans la partie C-terminale. Il a été montré que le coude de l'épingle contient un motif GP, et que la mutation de ce dernier empêche la maturation du sactipeptide (Himes et al., 2016). Il est intéressant de noter que la mutation du motif GP (Figure 5.11, résidus 18 et 19) de mRumC1 en AA bloque également la maturation du peptide.

5.3.6 Etude RMN de RumC1

Afin de confirmer le réseau de ponts thioéther au sein de mRumC1, nous avons initié une étude structurale par RMN du peptide mûri. Cette étude a été réalisée avec un échantillon mRumC1 marqué au carbone ^{13}C et à l'azote ^{15}N dans lequel la séquence leader a été clivée à la trypsine en fin de purification (Figure 5.11, la séquence leader en vert est clivée par un traitement à la trypsine). Pour des raisons d'homogénéités dans la suite du mémoire, je noterai ce peptide mûri sans sa séquence leader RumC1. Le clivage du peptide leader par la trypsine et le rôle de la séquence leader dans l'activité biologique de mRumC1 seront discutés en détail dans le chapitre 6.

Le spectre [^{15}N , ^1H] HSQC de cet échantillon montre des pics bien distincts qui correspondent aux corrélations NH des groupements amides des acides aminés de RumC1. Les signaux NH de trente-neuf résidus sur les quarante-deux de la chaîne principale ont été attribués. Les signaux NH de C26, G27 et N28 ne sont pas observés dans nos conditions expérimentales (pH et T). L'attribution séquentielle des corrélations NH a été réalisée sur la base d'expériences 3D, comprenant HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCA, HN(CO)CA, HNCO et HN(CA)CO. Un décalage dans le déplacement chimique des carbones α des acides aminés A12, N16, R34, K42 a été mis en évidence. Ces déplacements chimiques décalés de 15 ppm par rapport aux

valeurs des carbones α des résidus non modifiés (Figure 5.12 **a**). De tels déplacements chimiques pour les carbones α ont été observés pour les acides aminés partenaires des cystéines dans la subtilosin A, la thurincin H et la thurincin CD (Kawulka et al., 2003, 2004; Rea et al., 2010; Sit et al., 2011a). Les expériences TOCSY et ^{13}C -TOCSY-HSQC ont confirmé une complète substitution de ces acides aminés, qui ne présentent pas de proton α laissant suggérer que ces quatre résidus peuvent être impliqués dans des ponts thioéther. Les connexions de ces résidus avec leur partenaire a été déterminée par l'analyse des spectres NOESY et ^{15}N -NOESY-HSQC, montrant que les protons β de la cystéine C3 et le proton amide (NH) de N16, les protons β de la cystéine C5 et le proton amide d'A12, et les protons β de la cystéine C22 et le proton amide de K42 sont proches dans l'espace (Figure 5.12 **b**). Ces données permettent d'attribuer sans ambiguïté trois des quatre ponts thioéther entre C3 et N16, C5 et A12, et C22 et K42. Le quatrième pont n'a pas été déterminé en raison du pic non résolu de la cystéine C26, mais seule cette cystéine restante peut former un pont thioéther avec le carbone α du résidu R34 dans RumC1 (Chiumento et al., 2019). Sur la base des contraintes de distances interprotons, la structure tridimensionnelle de RumC1 est en cours de résolution par RMN.



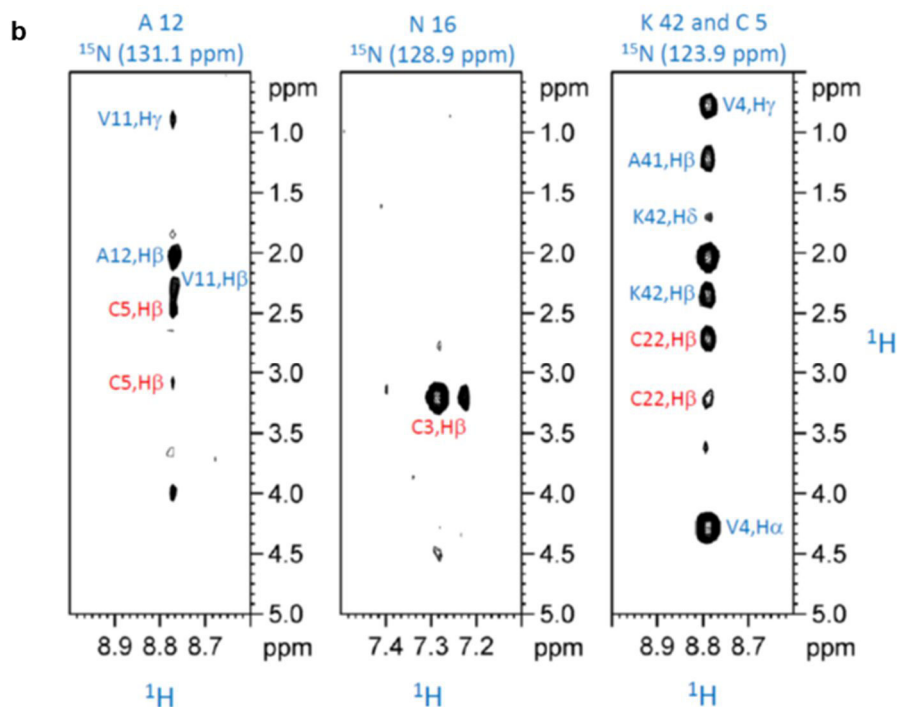


Figure 5.12 : Attribution des ponts thioéther de RumC1 par RMN. **a** Superposition des spectres HCNA montrant les corrélations entre les protons amide (HN_i) et les carbones α de son propre résidu ($\text{C}\alpha_i$) et du résidu précédent ($\text{C}\alpha_{i-1}$). Les connectivités séquentielles ($\text{HN}_i\text{-C}\alpha_{i-1}$) sont indiquées en vert. Les acides aminés pontés sont indiqués en rouge et les cystéines partenaires en bleue. On note les déplacements chimiques à 72,2, 68,6, 74,5 et 75,5 ppm pour les carbones α de A12, N16, R34, K42, respectivement. **b** Expérience ^{15}N -NOESY-HSQC. Trois fenêtres montrent les corrélations ^1H - ^1H des résidus A12/C5, N16/C3, K42/C22 en rouge (Chiumento et al., 2019).

A ce jour, les structures de trois sactipeptides ont été élucidées, la subtilosin A, la thuricin CD et la thurincin H. La structure de la subtilosin A est une boucle spiralée, rigidifiée, dont les chaînes latérales des acides aminés sont orientées vers l'extérieur. Cette structure est stabilisée par trois ponts thioéther entre C13-F22, C7-T28 et C4-F31. Il a été montré que la stéréochimie des acides aminés pontés F22, T28 et F31 est L, D et D respectivement (Kawulka et al., 2003, 2004). La présence d'un acide aminé D peut être expliquée par la présence d'un carbone radicalaire, presque plan, au cours de la formation du pont thioéther. L'attaque de la cystéine peut se faire des deux côtés du carbone radicalaire. La structure des deux composantes de la thuricin CD, Trn- α et Trn- β , consiste en une boucle composée de deux hélices α . Ces structures sont rigidifiées par trois ponts thioéther entre C13-S21, C9-T25 et C5-T28 pour Trn- α et C13-T21, C9-A25, C5-Y28 pour Trn- β . Les deux unités présentent un grand nombre de résidus hydrophobes dont la chaîne latérale pointe vers l'extérieur générant une surface hydrophobe. Des régions chargées positivement et négativement sont réparties sur les peptides conférant un caractère amphiphile aux deux peptides. Concernant la stéréochimie des acides aminés pontés, il a été montré

que pour Trn- α , S21, T25 et T28 sont L, L et D respectivement et pour Trn- β , T21, A25 et Y28 sont L, L et D respectivement (Sit et al., 2011b). Concernant la thurincin H, on retrouve une structure similaire à celle de Trn- α et Trn- β , avec une boucle composée de deux hélices α , rigidifiée par quatre ponts thioéther entre C13-N19, C10-T22, C7-T25 et C4-S28. Les acides aminés pontés ont tous une stéréochimie D. Les résidus hydrophiles sont regroupés sur une face de la thurincin H et les résidus hydrophobes sur une autre face conférant un caractère amphiphile à la bactériocine, comme pour la subtilosin A et la thuricin CD ce qui suggère une interaction potentielle de ce composé avec les membranes bactériennes (Sit et al., 2011a).

5.3.7 RumC1 produit par *R. gnavus* E1

Le but de ce paragraphe est de comparer les résultats que nous venons de décrire sur la configuration des quatre ponts thioéther de mRumC1 obtenu par maturation hétérologue chez *E. coli* avec ce même peptide mûré *in vivo*, obtenu à partir des contenus caecaux de rats mono-colonisés par *R. gnavus* E1. L'objectif étant de valider le protocole de maturation hétérologue comme source de production de RumC1 mûré. Le peptide ainsi produit sera utilisé pour l'évaluation de son activité biologique potentielle ainsi que l'étude de son mode d'action.

Ces travaux faisant partie de la thèse de Clarisse Roblin à l'ISM2, je ne décrirai ici que RumC1 produit par *R. gnavus* E1 chez le rat. Le protocole de purification à partir des contenus caecaux a permis d'isoler deux fractions contenant les cinq bactériocines RumC. L'analyse ciblée de RumC1 montre une masse de 4319,91 Da. Celle-ci correspond au peptide RumC1 de quarante quatre acides aminés, sans la séquence leader, avec une différence -8 Da par rapport à la masse théorique de 4327,91(Figure 5.13) (Chiumento et al., 2019).

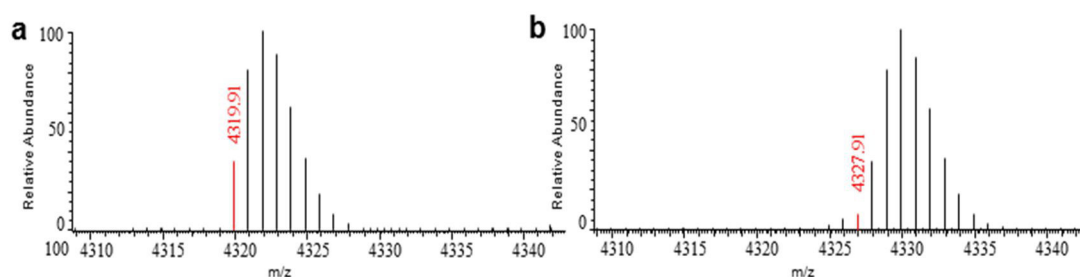


Figure 5.13 : Analyse par spectrométrie de masse de RumC1 purifié à partir des contenus caecaux de rats. **a** Spectre de masse déconvolué de RumC1. **b** Spectre de masse déconvolué de RumC1 synthétique non modifié (adaptée de Chiumento *et al.*, 2019).

L'analyse de RumC1 par spectrométrie de masse en tandem montre que les quatre acides aminés impliqués dans les ponts thioéther sont A12, N16, R34 et K42 (données présentées dans l'article en annexe I). Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons obtenus pour mRumC1, ils permettent donc de valider le protocole d'expression et de maturation hétérologue de RumC1.

Nous venons de voir que le peptide RumC1 produit par *R. gnavus* E1 chez le rat ne comporte plus de séquence leader. Pour conclure ce chapitre, nous allons évaluer l'importance de la séquence leader dans la biosynthèse de RumC1.

5.4 Rôle du peptide leader dans la maturation de RumC1

Quel que soit le groupe de RiPPs, le peptide précurseur contient toujours une séquence leader à l'extrémité N-terminale. De nombreux rôles ont été proposés pour ces séquences qui sont généralement clivées avant l'export du peptide mûri (Figure 5.14). La proposition la plus commune est l'implication dans la sécrétion du peptide, en jouant le rôle de séquence signal pour un transporteur codé génétiquement dans l'opéron. Le second rôle, souvent évoqué, est la présence d'un motif de reconnaissance au sein de la séquence leader accessible aux enzymes de maturation. La littérature indique également d'autres fonctions telles que la protection du peptide précurseur vis-à-vis des protéases présentes dans le milieu cellulaire ou encore le maintien du peptide dans un état inactif à l'intérieur de l'organisme producteur (Oman and van der Donk, 2010).

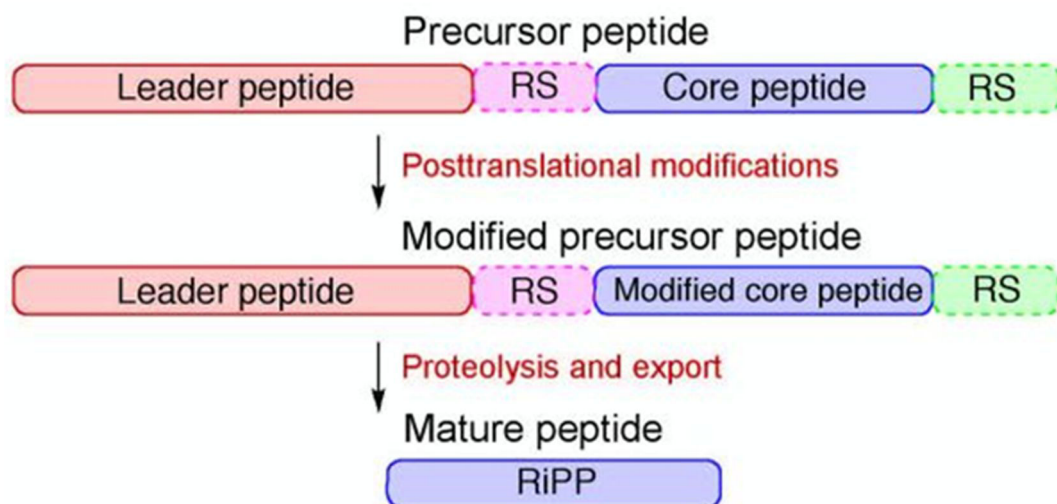


Figure 5.14 : Voie de biosynthèse générale des RiPPs. RS pour séquence de reconnaissance (Yang and van der Donk, 2013).

Le peptide leader de RumC1 est de dix-neuf acides aminés. Dans le cas des sactipeptides, ces séquences sont généralement courtes comparés aux autres RiPPs. Par exemple, les séquences leader de la subtilosin A, la thurincin H, Trn- α et Trn- β sont respectivement de huit, neuf, dix-sept et dix-neuf acides aminés (Zheng *et al.*, 1999; Oman and van der Donk, 2010). Seul Skf présente un peptide leader de vingt-neuf acides aminés, soit plus de la moitié du précurseur.

Afin de mieux comprendre le rôle du peptide leader dans la maturation de RumC1, nous avons réalisé différentes expériences. Dans un premier temps nous avons appliqué le protocole d'expression hétérologue à une variante du peptide nRumC1 ne comportant pas de séquence leader. Cette séquence de quarante-quatre acides aminés sera notée wplRumC1. L'analyse par spectrométrie de masse indique de façon majoritaire que wplRumC1 n'est pas mûré (Figure 5.15).

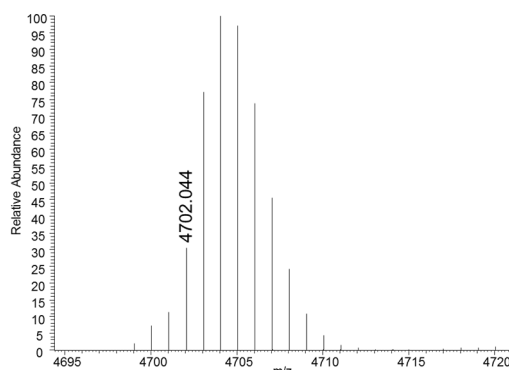


Figure 5.15 : Analyse par spectrométrie de masse de wplRumC1. La masse de 4702,044 Da correspond à la séquence de RumC1 plus les quatre résidus GAMD rajoutés pour des besoins de clonage.

Dans un deuxième temps nous avons évalué le rôle du peptide leader lors d'un test de maturation *in vitro*. Ce test, réalisé en atmosphère inerte a été effectué en présence d'une source d'électrons (dithionite), du cofacteur SAM, d'un réducteur (DTT), de l'enzyme holo-RumMc1 et différentes formes du peptide incluant nRumC1, wplRumC1 et un mélange stoechiométrique (1:1) wplRumC1:peptide leader de dix-neuf acides aminés que nous noterons PL19. Dans ces expériences, nous avons travaillé avec un rapport enzyme:substrat de 1:4.

Les mélanges réactionnels bruts ont été directement analysés par spectrométrie de masse. Le test d'activité réalisé avec nRumC1 conduit à une population très majoritaire dont la masse indique un écart de -8 Da par rapport au peptide non modifié. Ce résultat est cohérent avec les données observées lors de la maturation hétérologue de nRumC1, il indique la formation des quatre ponts thioéther que nous avons détaillé précédemment (Figure 5.16).

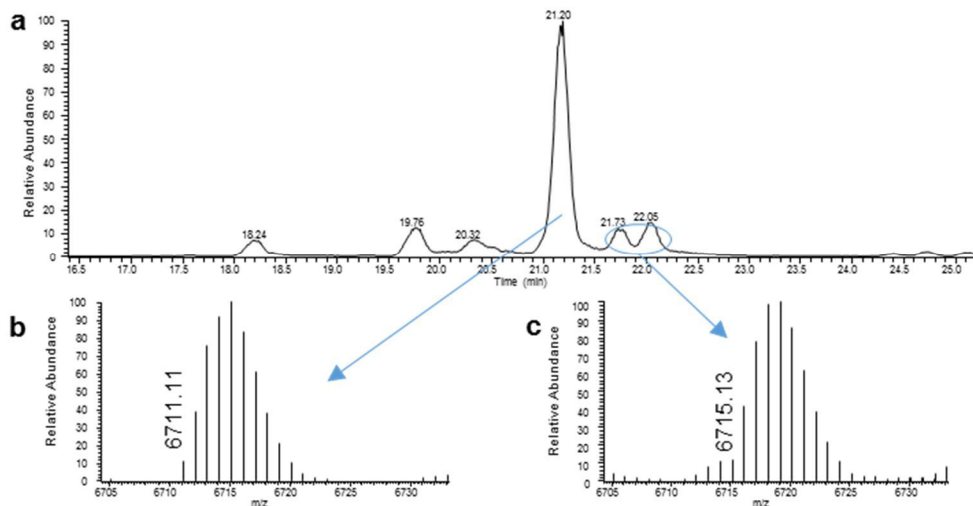


Figure 5.16 : Analyse par spectrométrie de masse de la réaction enzymatique de RumMc1 avec nRumC1. **a** Signal PRM (*parallel reaction monitoring*) de l'ion 960,8 (7+). **b** Spectre de masse déconvolué de l'espèce majoritaire à 21,20 min. **c** Spectre de masse déconvolué des espèces minoritaires à 21,73 et 22,05 min. La masse de 6715,13 Da suggère une forme oxydée de nRumC1 avec deux ponts disulfures.

L'analyse en spectrométrie de masse du test de maturation *in vitro* effectué avec wplRumC1 indique que le peptide précurseur seul sans la séquence leader n'est pas modifié par l'enzyme RumMc1 (Figure 5.17).

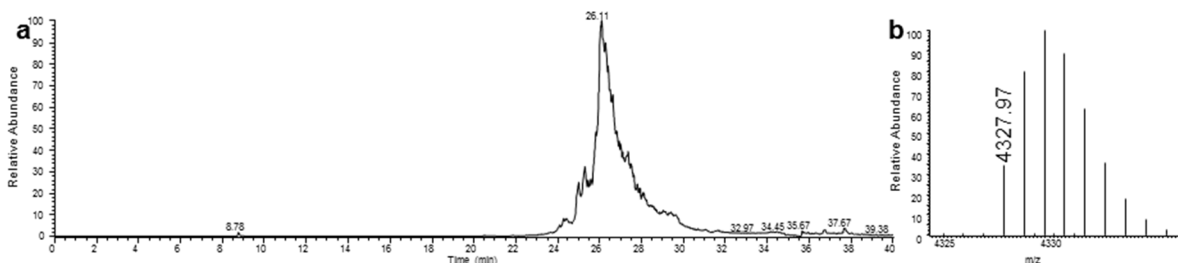


Figure 5.17 : Analyse par spectrométrie de masse de la réaction enzymatique de RumMc1 avec wplRumC1. **a** Signal PRM de l'ion 1083 (4+). **b** Spectre de masse déconvolué de l'espèce à 26,11 min. La masse de 4327, 97 Da correspond à wplRumC1 non modifié.

Lorsque le test est réalisé en présence d'un mélange wplRumC1 et PL19 dans un rapport 1/1, l'analyse en spectrométrie de masse indique majoritairement que le peptide wplRumC1 n'est pas modifié. Cependant, il est intéressant de noter la présence d'une population avec un défaut de masse de -8 unités à 4319.87 Da correspondant au peptide wplRumC1 mûré (Figure 5.18).

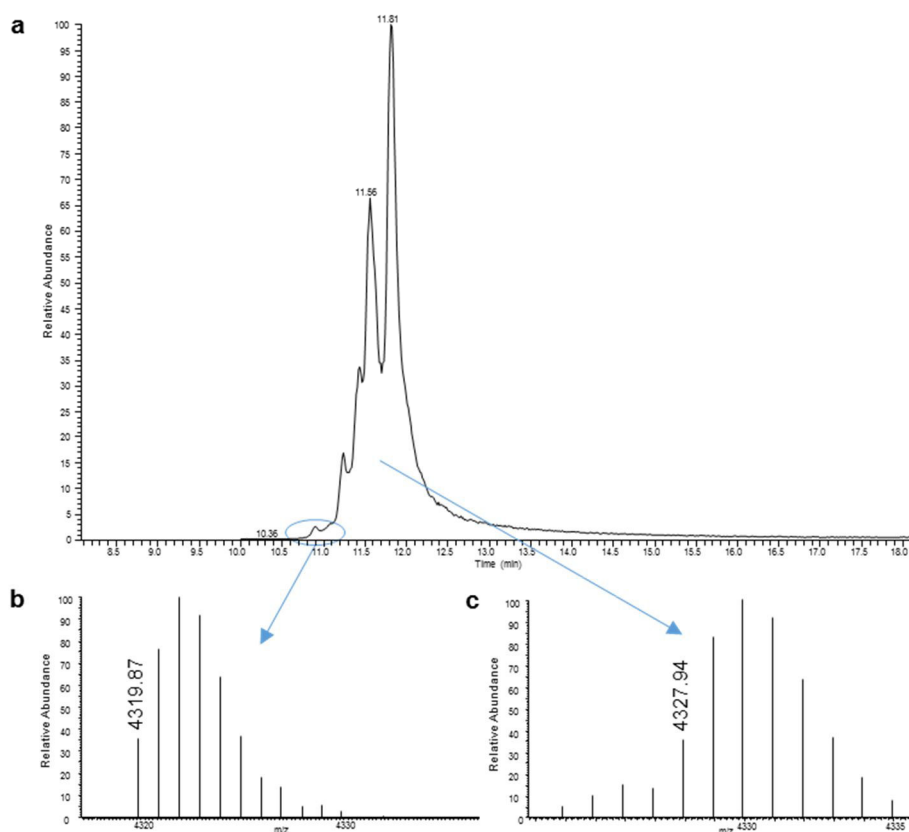


Figure 5.18 : Analyse par spectrométrie de masse de la réaction enzymatique de RumMc1 avec wplRumC1 et PL19. **a** Signal PRM (*parallel reaction monitoring*) de l'ion 1083 (4+). **b** Spectre de masse déconvolué de l'espèce minoritaire à 10,9 min. **c** Spectre de masse déconvolué des espèces majoritaires à 11,56 et 11,81 min.

Ce résultat souligne l'importance de la séquence leader dans l'activation de l'enzyme radical-SAM et la modification du substrat peptidique. Dans ce sens, les interactions de l'enzyme avec le peptide leader et le substrat se font très probablement dans deux domaines différents, un domaine de reconnaissance du peptide leader et un domaine de fixation du peptide précurseur. Nous pouvons supposer que l'interaction de la séquence leader avec l'enzyme conduit à un réarrangement structural de celle-ci lui permettant de fixer le substrat.

5.4.1 Rôle du peptide leader dans la maturation de RiPPs

La maturation en *trans* (séquence leader en solution avec la partie à modifier) des RiPPs a déjà été démontrée. Prenons le cas de l'enzyme de maturation PatD modifiant PatE, le précurseur dans la biosynthèse des cyanobactines patellamide A et patellamide C. Cette enzyme introduit quatre cycles azoline via un mécanisme de cyclodéshydratation (Figure 5.19).

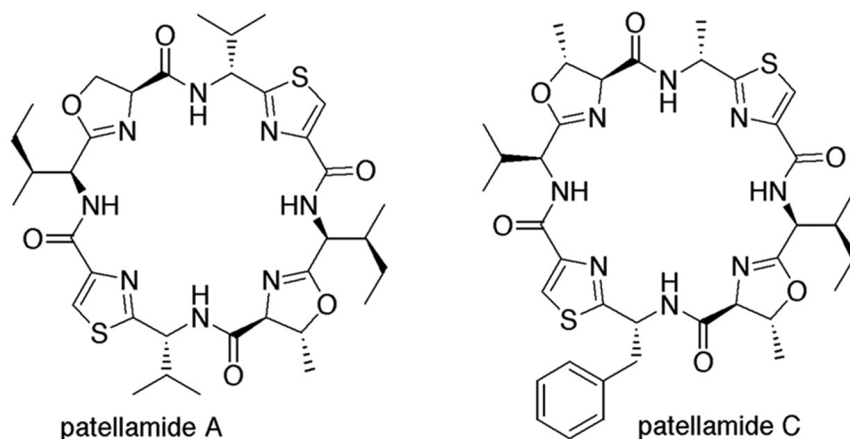


Figure 5.19 : Structure de la patellamide A et patellamide C (W Schmidt et al., 2005).

Il a été montré que lorsque la séquence leader du peptide PatE est retirée, PatD ne peut pas modifier complètement PatE et introduit au maximum une fonction azoline par cyanobactine. Cependant lorsque la séquence leader est présente dans le milieu réactionnel, une population majoritaire présentant quatre cycles azoline est identifiée par spectrométrie de masse (Goto et al., 2014).

Un second exemple concerne la biosynthèse de la cyanobactine LynE modifiée par l'hétérocyclase LynD, capable d'introduire deux cycles azoline. Les séquences leader de LynE et PatE étant identiques, la maturation de PatE par LynD a été évaluée. Une étude cinétique de la formation des deux cycles a été faite avec le peptide PatE complet, PatE sans la séquence leader ou avec la présence de celle-ci dans le milieu réactionnel. Dans le cas du peptide complet, les deux cycles sont formés en trois heures. Ce résultat indique que l'enzyme LynD est capable de modifier un autre substrat que LynE. Pour le peptide sans la séquence leader, les auteurs observent seulement la formation du premier cycle en trois heures. Cependant, en présence de la séquence leader dissociée du peptide, la formation du premier cycle est significativement plus rapide et la modification complète du peptide est également détectée (Figure 5.20). Cette activation *trans* reste cependant moins rapide que lorsque le peptide est complet (Koehnke et al., 2015). De plus un autre test a été réalisé avec une séquence leader plus courte dans le milieu réactionnel, ce qui aboutit à une modification du peptide mais avec une cinétique plus lente qu'avec la séquence leader entière. Enfin une protéine fusion de LynD avec la séquence leader de PatE à l'extrémité N-terminale a montré une vitesse de réaction identique au test avec le peptide complet et LynD. Ces données démontrent

que la séquence leader est nécessaire à l'activation de la maturase et à la biosynthèse d'un RiPPs (Koehnke et al., 2015). Concernant la maturation de RumC1, nous avons vu RumMc1 est capable de modifier wplRumC1 avec la séquence leader en solution. Cependant cette population est minoritaire et nous proposons d'étudier le test de maturation RumMc1/wplRumC1 sur des temps de réactions plus long, à l'instar de ce qui a été fait pour LynD, afin de déterminer si la proportion de population modifiée augmente au cours du temps.

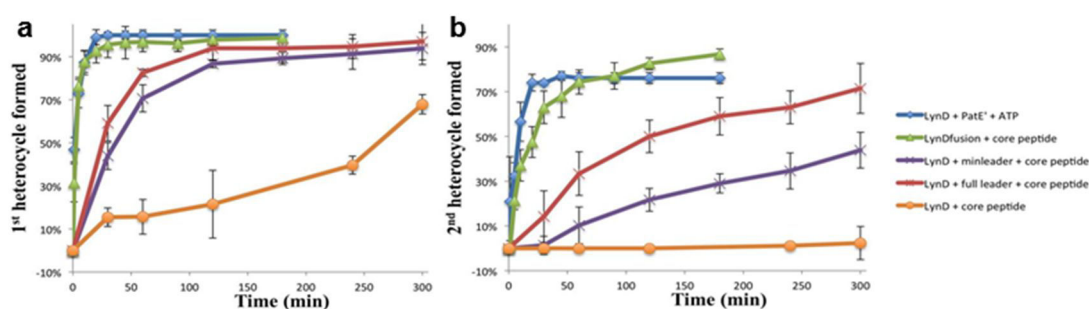


Figure 5.20 : **a** Cinétique de formation du premier hétérocycle en *trans* et *cis* activation. En bleu : enzyme LynD + précurseur PatE + ATP, en vert : LynD fusionné avec le peptide leader, en violet : LynD + PatE sans leader + leader minimum, en rouge : LynD + PatE sans leader + leader complet, en orange : LynD + PatE sans leader. **b** Cinétique de formation du second hétérocycle (Koehnke et al., 2015).

Les travaux de l'équipe de Van der Donk sur l'haloduracin ont permis de proposer un modèle d'activation des enzymes de maturation. L'haloduracin est un lanthipeptide à deux composantes Hal α et Hal β , provenant de la maturation des peptides HalA1 et HalA2 par HalM1 et HalM2 respectivement. En travaillant sur l'interaction entre HalM2 et son substrat HalA2, ils ont montré que l'affinité de l'enzyme pour le substrat complet et pour la séquence leader seule est similaire ($K_d=1,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ et $K_d=3,7 \pm 1,3 \mu\text{M}$ respectivement). Cependant pour HalA2 sans séquence leader cette affinité est fortement diminuée ($K_d>500 \mu\text{M}$). Ce résultat démontre clairement que l'affinité de l'enzyme HalM2 pour son substrat HalA2 est dépendant de la séquence leader (Thibodeaux et al., 2015).

Deux modes de fixation du précurseur ont été proposés : le premier est la fixation du peptide via la séquence leader sur une forme inactive de l'enzyme. Cette fixation engendre un réarrangement structural aboutissant à l'apparition d'un site de fixation pour la partie du substrat qui va subir les modifications. Le second mode propose qu'il existe deux états pour l'enzyme de maturation, un actif et un inactif. Ces deux états sont en équilibre au sein de l'organisme producteur, la forme active étant minoritaire. L'interaction de la forme active avec la séquence leader, déplace l'équilibre vers cette forme ce qui favorise alors la fixation du peptide et l'étape de maturation (Figure 5.21) (Thibodeaux et al., 2015).

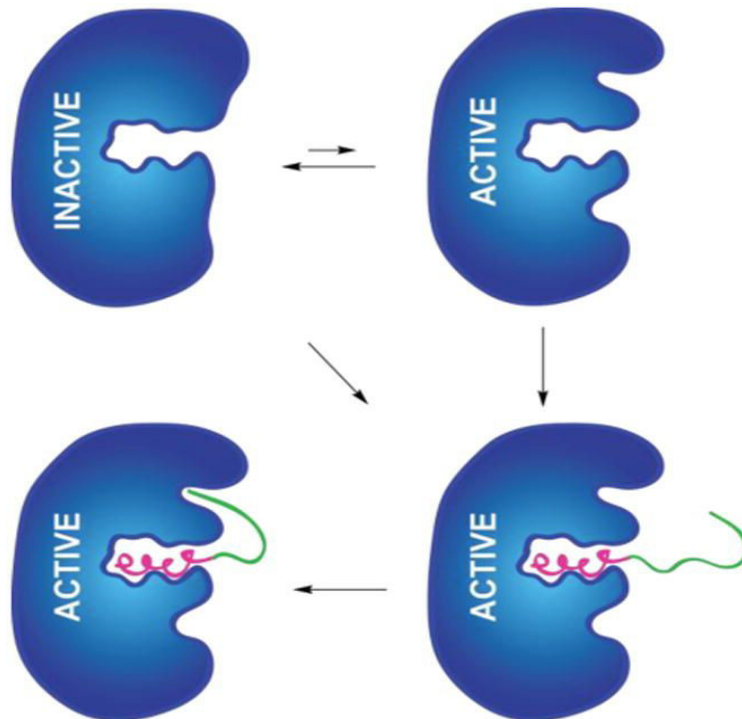


Figure 5.21 : Modèle d'activation des lanthipeptides synthetases LanM. L'enzyme est représentée en bleu, la séquence leader du substrat est en rose et le reste du peptide en vert. La flèche en diagonale représente le premier modèle ou la fixation du précurseur engendre un changement de conformation de l'enzyme. L'équilibre entre forme active et inactive représente le second modèle (Thibodeaux et al., 2015).

5.4.2 Mutagenèse dirigée de la séquence leader de RiPPs

Nous avons vu que la séquence leader a un rôle clé dans la biosynthèse des RiPPs en jouant notamment sur l'affinité d'une enzyme pour son substrat peptidique. Plusieurs études par mutagenèse dirigée ont été menées afin d'identifier un motif particulier au sein d'une séquence leader nécessaire à la reconnaissance du peptide. Prenons par exemple la venezuelin, un lanthipeptide de classe IV. L'équipe de Van der Donk a montré dans un premier temps, en mutant la séquence leader par blocs de quatre et cinq acides aminés en alanine, que la maturation du peptide n'était pas affectée. Cependant lorsque l'extrémité N-terminale de la séquence leader est tronquée, l'enzyme n'est plus capable de modifier son substrat. Ces résultats suggèrent que le motif de reconnaissance de l'enzyme est réparti sur la totalité de la séquence leader (Hegemann and van der Donk, 2018).

Une autre étude sur la biosynthèse du nosiheptide a mis en évidence des acides aminés essentiels à la maturation sur la séquence leader. L'alignement de plusieurs précurseurs peptidiques de thiopeptides montre la conservation de certains acides aminés au sein de la séquence leader. La mutation de ces résidus en alanine sur NosM, précurseur du nosihpetide, montre une diminution de plus de 60 % de sa production (Figure 5.22) (Jin et al., 2017).

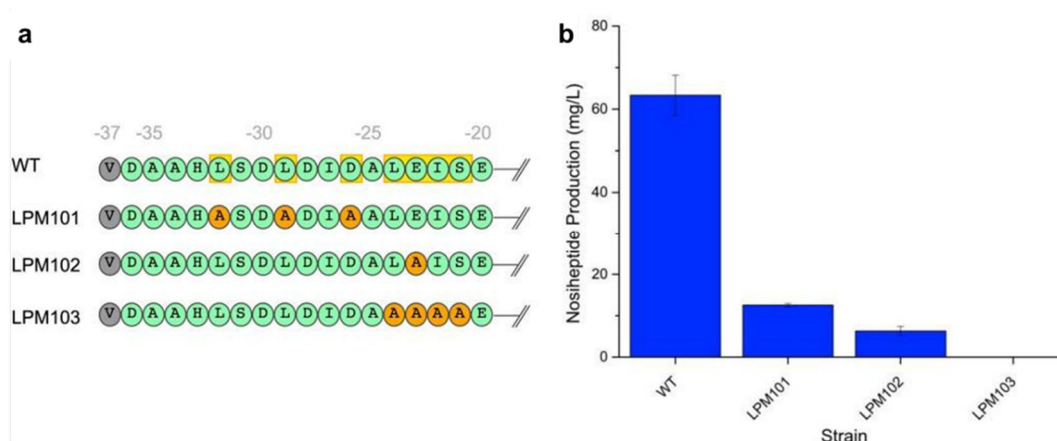


Figure 5.22 : **a** Mutations sur la séquence leader de NosM. En jaune les acides aminés conservés sur différents thiopeptides. En orange les mutations en alanine et en vert la séquence original. **b** Production du nosiheptide en fonction des différentes mutations (Jin et al., 2017).

Nous venons de pointer l'importance de la séquence leader dans la fixation du substrat peptidique par l'enzyme de maturation. Son rôle dans la maturation des bactériocines RumC reste à approfondir. Cela implique entre autres des mesures de constantes d'affinité et des expériences de mutagenèse dirigée. Dans ce sens un simple alignement des 5 séquences des bactériocines RumC montre la conservation du motif TGXXFEG dans la séquence leader (Figure 5.23). Il serait intéressant de muter ces résidus, individuellement ou en bloc, pour étudier leur importance dans la biosynthèse des bactériocines RumC.

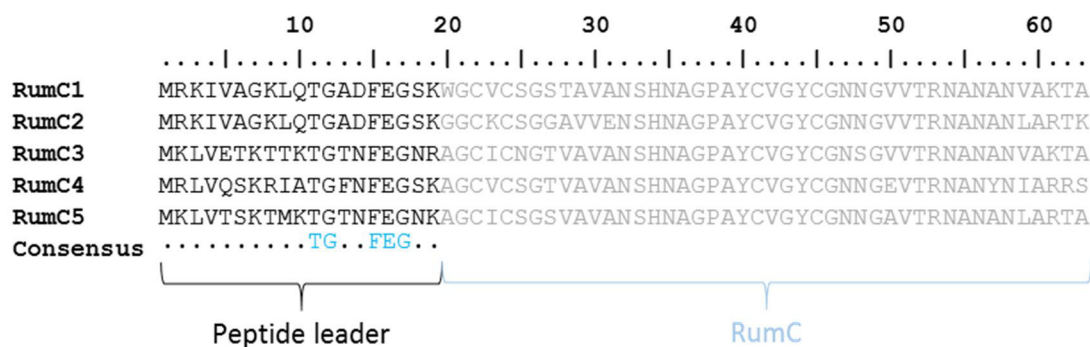


Figure 5.23 : Alignement des séquences des bactériocines RumC. On observe la conservation du motif TGXXFEG à travers les cinq séquences leader des bactériocines RumC.

Chapitre 6 : Activité antibactérienne de RumC1

La caractérisation par spectrométrie de masse confirme que les peptides RumC appartiennent à la famille des sactipeptides. De plus le système d'expression hétérologue de RumC1 chez *E. coli* nous permet de produire des quantités compatibles avec l'étude du mode d'action de ce peptide et l'évaluation de son activité antibactérienne.

Dans le chapitre précédent nous avons discuté du rôle du peptide leader au cours de la biosynthèse des RiPPs. De plus, le peptide leader peut également jouer un rôle immunitaire vis-à-vis du peptide antimicrobien en protégeant son organisme producteur, mais ce rôle ne sera pas développé dans ce mémoire.

Au cours de ce chapitre, nous déterminerons dans un premier temps le rôle du peptide leader sur l'activité biologique de RumC1.

Dans un second temps, les MIC (concentration minimale inhibitrice) de RumC1 vis-à-vis de différentes souches bactériennes seront présentées. Cette étude sera complétée par des tests de toxicité sur des cellules eucaryotes et nous évaluerons également l'induction potentielle de résistance. Enfin, nous concluons ce chapitre avec les résultats préliminaires obtenus portant sur l'identification du mode d'action de RumC1 sur *C. perfringens*.

L'ensemble du travail sur l'activité biologique de RumC1 a été effectué en collaboration avec l'équipe de Josette Perrier au sein de l'ISM2-BiosCiencés à Marseille. Ces expériences ont été réalisées par Clarisse Roblin dans le cadre de sa thèse.

6.1 Rôle du peptide leader dans l'activité antimicrobienne de RumC1

De nombreux systèmes de production *in vitro* des RiPPs ont été décrits dans la littérature. On peut citer les systèmes d'expression et de maturation hétérologue ou les tests de réactivité enzymatique avec les formes purifiées de l'enzyme et du peptide. Pour obtenir une forme maturée biologiquement active du RiPP, il est nécessaire de cliver le peptide leader lors d'une dernière étape. (Si et al., 2018). Naturellement, ce clivage est effectué par une protéase codée génétiquement au sein de l'opéron responsable de la biosynthèse du RiPP. Cependant, ces activités protéasiques sont souvent portées par des transporteurs ABC associés à la membrane, ou n'ont parfois pas été identifiées, ce qui représente une barrière majeure pour le clivage naturel du peptide leader (Bindman et al., 2010).

C'est pourquoi, différentes stratégies ont été utilisées pour le clivage du peptide leader. La plus commune, consiste à introduire un site de reconnaissance pour une protéase commerciale (e. g. trypsine, LysC ou GluC) (Bindman et al., 2015). Une autre stratégie est d'insérer un acide aminé non-naturel tel que le 2-nitrophenyl ou le 2-nitroveratrole permettant un photo-clivage spécifique de la séquence leader. Prenons l'exemple de la lacticin 481, un lanthipeptide issu de la maturation du précurseur LctA par l'enzyme LctM introduisant deux résidus Lan, un MeLan et un Dhb (Figure 6.1 a). Alors qu'il n'y a aucun problème pour reconstituer l'activité de la maturase, la digestion par la protéase Lys-C génère le Δ 1-lacticin 481 avec la lysine N-terminale manquante. Afin de garder cette lysine, présente dans la séquence du peptide produit par *L. lactis*, il a été incorporé au peptide obtenu par synthèse sur résine un résidu photosensible entre la séquence leader et la partie à modifier du substrat (2-nitrophényl). L'incubation de ce substrat avec LctM aboutit aux modifications post-traductionnelles attendues. L'irradiation de ce peptide modifié à 365 nm aboutit à la lacticin 481 (Figure 6.1 b) (Bindman et al., 2010). L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'obtenir le peptide complet et qu'elle est indépendante de la séquence, laissant ainsi la possibilité de l'appliquer au clivage de différents peptides leader.

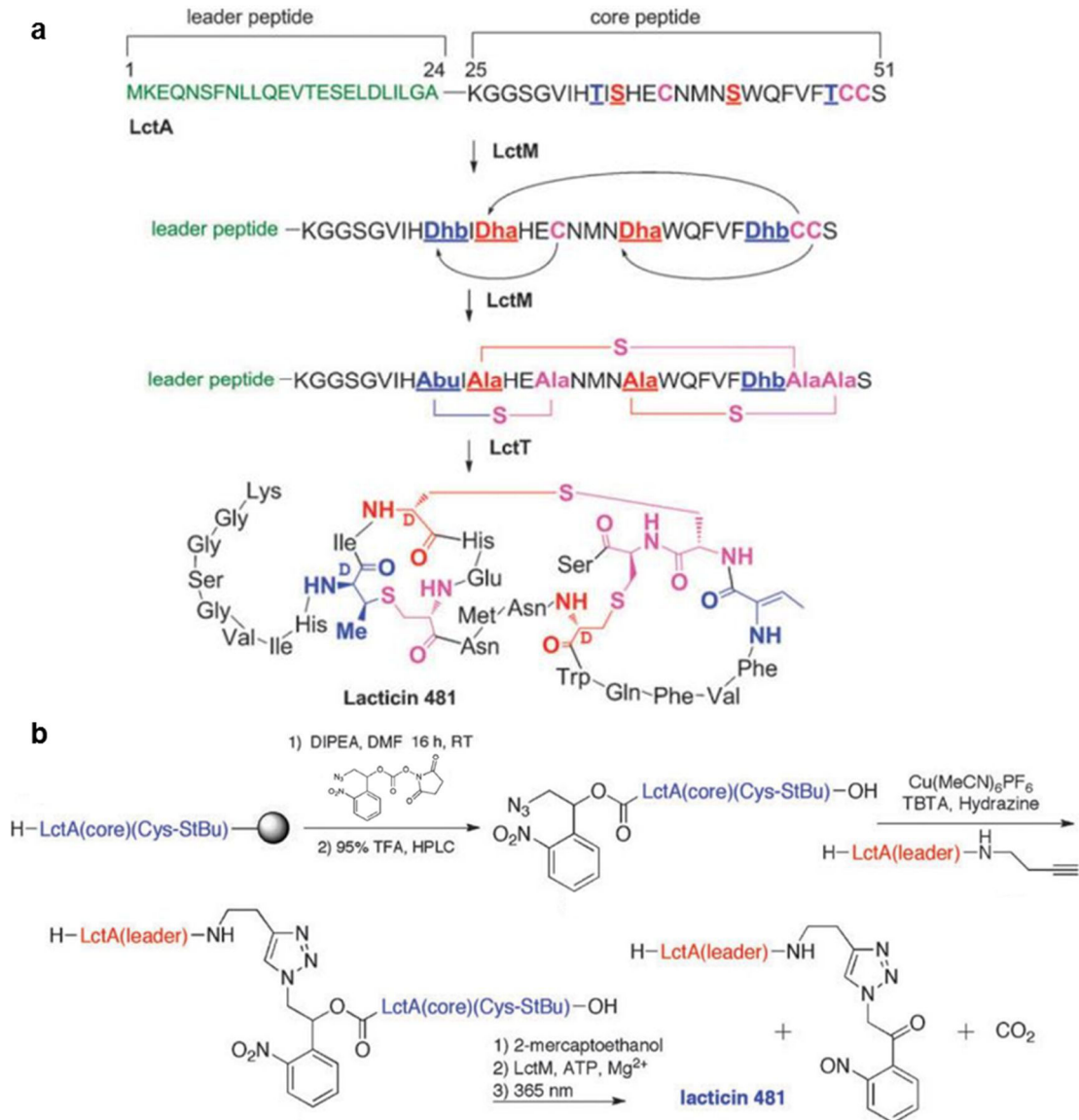


Figure 6.1 : **a** Biosynthèse de de la lacticin 481. LctM modifie le précurseur LctA en une structure polycyclique. Le transporteur LctT coupe le peptide leader et exporte la lacticine 481 active. **b** Synthèse du précurseur modifié présentant un linker photosensible, clivable par une excitation à 365 nm (adaptée de Bindman *et al.*, 2010).

Le même groupe a développé par la suite une nouvelle stratégie pour le clivage du peptide leader de la lacticin 481. La machinerie de synthèse par voie ribosomale d'*E. coli* est capable d'incorporer des résidus hydroxylés aboutissant à la formation de ponts ester. Dans le cas de la lacticin 481, l'introduction d'une lysine hydroxylée en position 1 permet de relier la séquence leader à cette lysine par une fonction ester. Le clivage par hydrolyse alcaline conduit ensuite au lanthipeptide mûré (Bindman *et al.*, 2015). Une autre possibilité est de cliver le leader lors de la production hétérologue du peptide. Un tel système est basé sur la compartimentation cellulaire. En effet, le peptide précurseur et les enzymes de

maturation sont exprimés dans le cytosol tandis que la protéase l'est au niveau de l'espace périplasmique (Figure 6.2). Séparer ces évènements permet, d'une part, d'assurer une modification complète du peptide et d'éviter le clivage simultané de la séquence leader et donc la libération d'un produit potentiellement toxique pour l'hôte. La production de l'haloduracin et de la lacticin 481 chez *E. coli* a été faite selon cette technique (Si et al., 2018). La détection du peptide complètement modifié se fait par l'observation d'un halo d'inhibition contre *L. lactis* sur boîte LB Agar et par spectrométrie de masse. L'avantage de ce système est qu'il ne requiert qu'une seule étape de purification, et qu'il permet de détecter rapidement l'activité biologique de différents mutants du peptide étudié. Les méthodes décrites ci-dessus ont été mises au point pour des lanthipeptides, mais il est envisagé de les appliquer à d'autres classes de RiPPs.

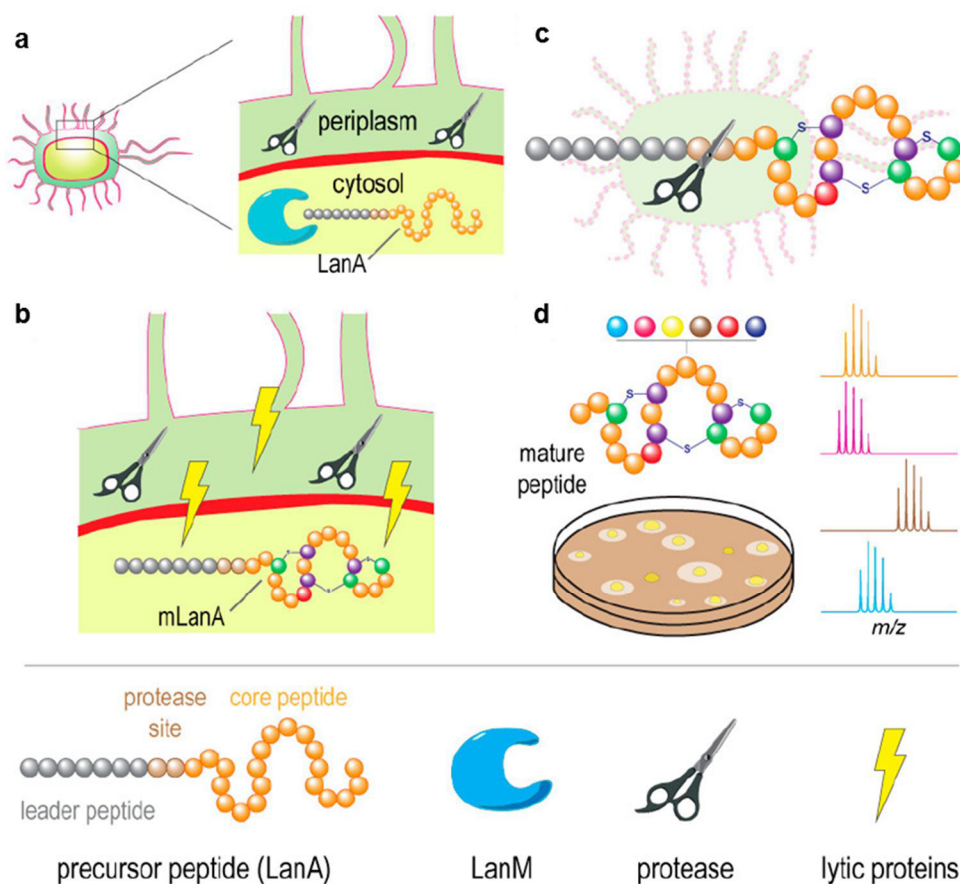


Figure 6.2 : Système d'expression permettant de produire des lanthipeptides matures chez *E. coli*. **a** Compartimentation périplasmique de la protéase. **b** Induction de l'expression des protéines lytiques, nécessaires à la lyse cellulaire, par changement de température. **c** Coupure du peptide leader après la lyse cellulaire. **d** Détection des lanthipeptides matures par test de diffusion dans l'agar et par analyse en spectrométrie de masse MALDI-ToF (Si et al., 2018).

La séquence leader de RumC1 est composée de dix-neuf acides aminés et se termine par une lysine (Fig 6.3 a). La présence de ce résidu combinée au fait que la biosynthèse des bactériocines RumC est corrélée avec la présence de trypsine

(Ramare et al., 1993), nous a conduit à digérer mRumC1, produit par expression hétérologue par cette enzyme. L'analyse en spectrométrie de masse montre une masse de 4319,89 Da correspondante au peptide RumC1 complètement mûré avec quatre ponts thioéther sans la séquence leader. La masse de ce peptide est identique à celle de la bactériocine RumC1 produite par *R. gnavus* E1 et purifiée à partir des contenus caecaux de rats (Figure 6.3 b). Il faut noter que le peptide n'est pas clivé au niveau des deux résidus R34 et K42 qui sont impliqués dans les ponts thioéther. Ce résultat indique que la structure acquise par RumC1 mûré le protège d'une digestion à la trypsine. Nous avons testé le peptide RumC1 avec ou sans la séquence leader contre *C. perfringens* sur un test d'inhibition en milieu solide BHI-YH agar. Un halo d'inhibition synonyme de forme active de RumC1 est observable uniquement lorsque ce dernier est digéré par la trypsine. Cette activité dépend donc de la présence ou non de la séquence leader (Figure 6.3 c) (Chiumento et al., 2019).

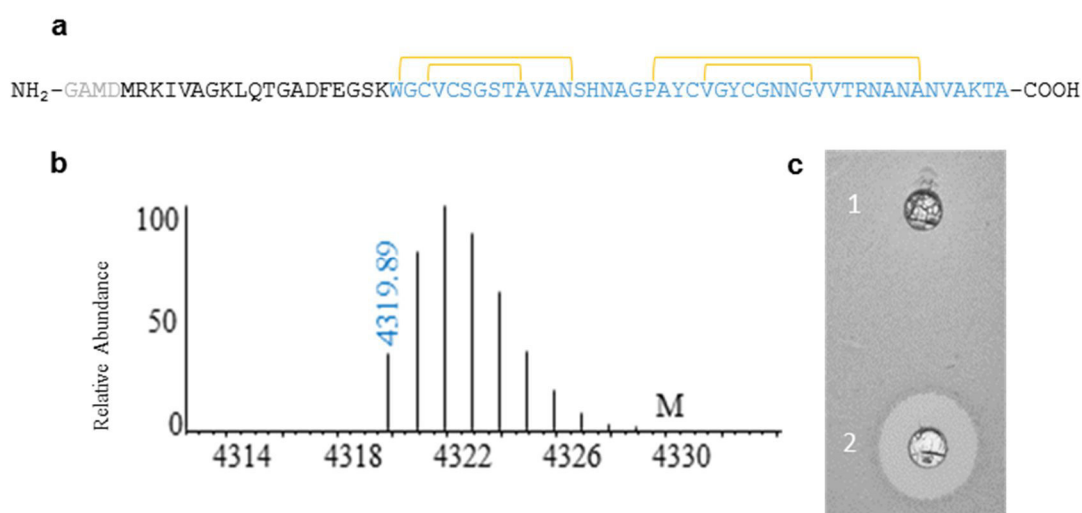


Figure 6.3 : Digestion à la trypsine de mRumC1. **a** Séquence de mRumC1, en noir le peptide leader, en bleu la séquence de RumC1 présentant les quatre ponts thioéther en jaune, en gris les acides aminés ajoutés pour des facilités de clonage. **b** Spectre de masse de RumC1 digéré à la trypsine correspondant à la séquence W₁GCVCSGSTAVANSHNA...RNANANVAKTA₄₄. **c** Inhibition de *C. perfringens* par RumC1. Avant (1) et après (2) digestion à la trypsine (adaptée de Chiumento *et al.*, 2019).

Nous l'avons mentionné dans le chapitre 3, l'opéron responsable de la biosynthèse des bactériocines RumC contient un gène codant la protéase putative RumPc (Pujol et al., 2011). Nos collaborateurs ont produit cette enzyme afin de vérifier sa fonction et d'étudier son action sur mRumC1. La digestion de mRumC1 par RumPc conduit à une coupure partielle du peptide leader, où les cinq derniers acides aminés de la séquence leader (FEGSK) sont conservés. A l'instar de mRumC1 avec la séquence leader, ce peptide partiellement clivé demeure inactif contre *C. perfringens*, mais un second clivage séquentiel à la trypsine permet d'ôter ces cinq

résidus FEGSK de RumC1 et de libérer une forme mature et active de RumC1 (Figure 6.4) (Chiumento et al., 2019).

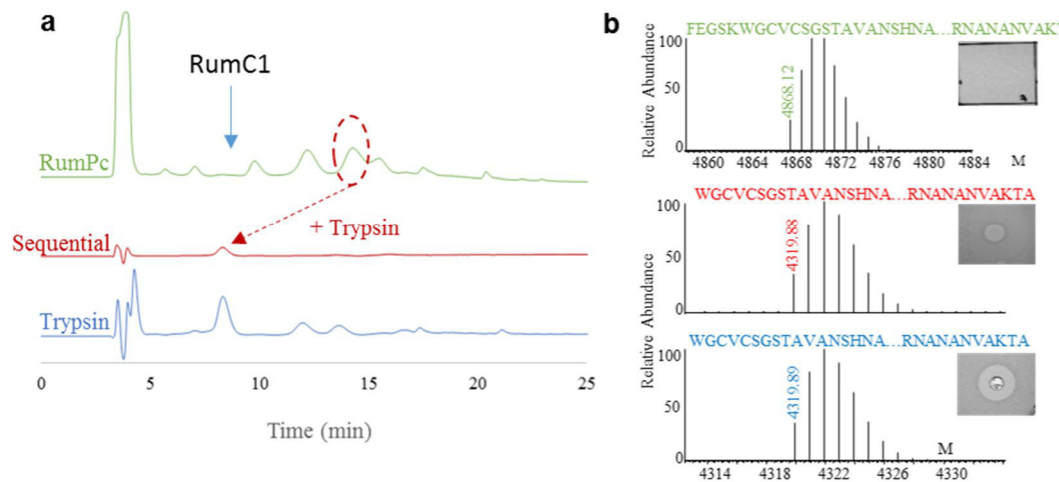


Figure 6.4 : **a** Chromatogramme HPLC de mRumC1 digéré par RumPc (vert), de façon séquentielle par RumPc puis la trypsine (rouge) et uniquement par la trypsine (bleu). **b** Masses observées des différents produits de digestion et inhibition de *C. perfringens* par les peptides respectifs. Digestion par RumPc (vert), RumPc puis trypsine (rouge) et trypsine (bleu) (Chiumento et al., 2019).

Dans les expériences qui suivent dont le but est de caractériser l'activité biologique de RumC1 et d'étudier son mode d'action nous utiliserons le peptide mRumC1 produit par expression hétérologue et clivé à la trypsine. Une étape de purification par HPLC en phase inverse est nécessaire afin de purifier RumC1 après clivage (Figure 6.4 a).

6.2 Activité biologique de RumC1

Le spectre d'activité antimicrobienne de RumC1 a été étudié contre une large gamme de bactéries à Gram positif et à Gram négatif, incluant des souches pathogènes et des souches résistantes à des antibiotiques. Dans ces expériences nous avons distingué l'effet bactéricide de l'effet bactériostatique en déterminant les concentrations minimales bactéricides (MBC) de RumC1 (Figure 6.6). Tout d'abord RumC1 est efficace contre les clostridies, les valeurs de MIC et MBC sont globalement à l'échelle du micromolaire. Par exemple, une MBC de 1,56 μM a été déterminée contre *C. perfringens*, troisième cause d'infection alimentaire aux Etats-Unis (après Norovirus et *Salmonella*) ce qui souligne l'intérêt de ce peptide (Centers for Disease Control and Prevention, 2018c). RumC1 présente également un effet intéressant contre *C. difficile* ($6,25 \mu\text{M} < \text{MBC} < 12,5 \mu\text{M}$), un pathogène faisant partie des souches prioritaires, toujours selon le CDC (Chapitre 1). Une MBC de 0,4 μM a également été observée contre *C. botulinum*, un pathogène responsable du botulisme alimentaire (dû à la présence d'une toxine botulique au sein des aliments), du botulisme infantile (résultant de la colonisation intestinale par des spores de *C.*

botulinum) et du botulisme d'inoculation (dû à l'infection de blessures). Par ailleurs, RumC1 est aussi efficace contre des souches résistantes à Gram positif telles que MRSA et *E. faecalis* résistant à la vancomycine (VER) avec des MIC de l'ordre du micromolaire ($0,8 \mu\text{M} < \text{MIC} < 50 \mu\text{M}$). Bien que les tests aient été réalisés sur un large panel de bactérie, RumC1 n'a pas montré d'effet contre les bactéries à Gram négatif avec des MIC supérieures à $100 \mu\text{M}$. Enfin, excepté pour la souche MRSA, les valeurs de MIC et de MBC sont identiques, ce qui suggère que l'effet de RumC1 sur les bactéries à Gram positif testées est bactéricide (Chiumento et al., 2019).

Bacteria	Strain	MIC (μM)	MBC (μM)
<i>Clostridium perfringens</i>	ATCC 13124	1.56	1.56
<i>Clostridium difficile</i>	DSMZ 1296	6.25	6.25 – 12.5
<i>Clostridium botulinum</i>	DSMZ 1985	0.4	0.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P	25	25 - 50
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA ¹	ATCC BAA-1717	50	> 100
<i>Enterococcus faecalis</i> VER ²	DSMZ 13591	12.5	25
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	0.4	0.4
<i>Bacillus subtilis</i> NR ³	DSMZ 347	0.8	0.8
<i>Clostridium coccoïdes</i>	ATCC 29236	1.56 – 3.13	1.56 – 3.13

¹MRSA=Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, ²VER=Vancomycin-Resistant, ³NR=Nisin-Resistant.

Tableau 6.1 : Spectre d'activité de RumC1 contre une sélection de bactéries à Gram positif. Les souches à Gram négatif qui présentent une MIC supérieure à $100 \mu\text{M}$ sont : *Salmonella enterica* CIP 80.39, *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* MR4 DSMZ 22314, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *P. aeruginosa* résistant au fluoroquinolone CIP 107398, *A. baumannii* CIPP 103572, *A. baumannii* multi-résistant CIP 110431, *K. pneumoniae* MR4 DSMZ 26371 (Chiumento et al., 2019).

Posséder une activité antimicrobienne intéressante n'est pas une propriété suffisante pour initier le développement d'une molécule thérapeutique, il est nécessaire que cette dernière ne présente pas de toxicité pour l'hôte et qu'elle n'induisse pas de résistance rapidement. La cytotoxicité de RumC1 a été évaluée sur deux lignées cellulaires intestinales (Caco2 et T84) et une lignée cellulaire gastrique (N87). Après traitement par RumC1, le métabolisme cellulaire a été évalué par un test à la rézasurine (Anoopkumar-Dukie et al., 2005). A des concentrations supérieures à $200 \mu\text{M}$, RumC1 n'affecte pas la viabilité cellulaire. Les activités métaboliques des lignées Caco2, N87 et T84 sont respectivement de 90, 80 et 70 %, par rapport à l'activité des cellules non traitées (Figure 6.5 a). En complément, dans la même gamme de concentration, RumC1 ne présente pas de pouvoir hémolytique sur une lignée érythrocytaire humaine (Figure 6.5 b). Enfin, il a été montré qu'en traitant une souche de *C. perfringens* par RumC1 durant plus de trente jours, celle-ci ne développait pas de résistance significative contrairement au métronidazole qui

entraîne rapidement l'émergence d'une résistance avec une augmentation de la MIC de plus de cent fois (Figure 6.5 c) (Chiumento et al., 2019).

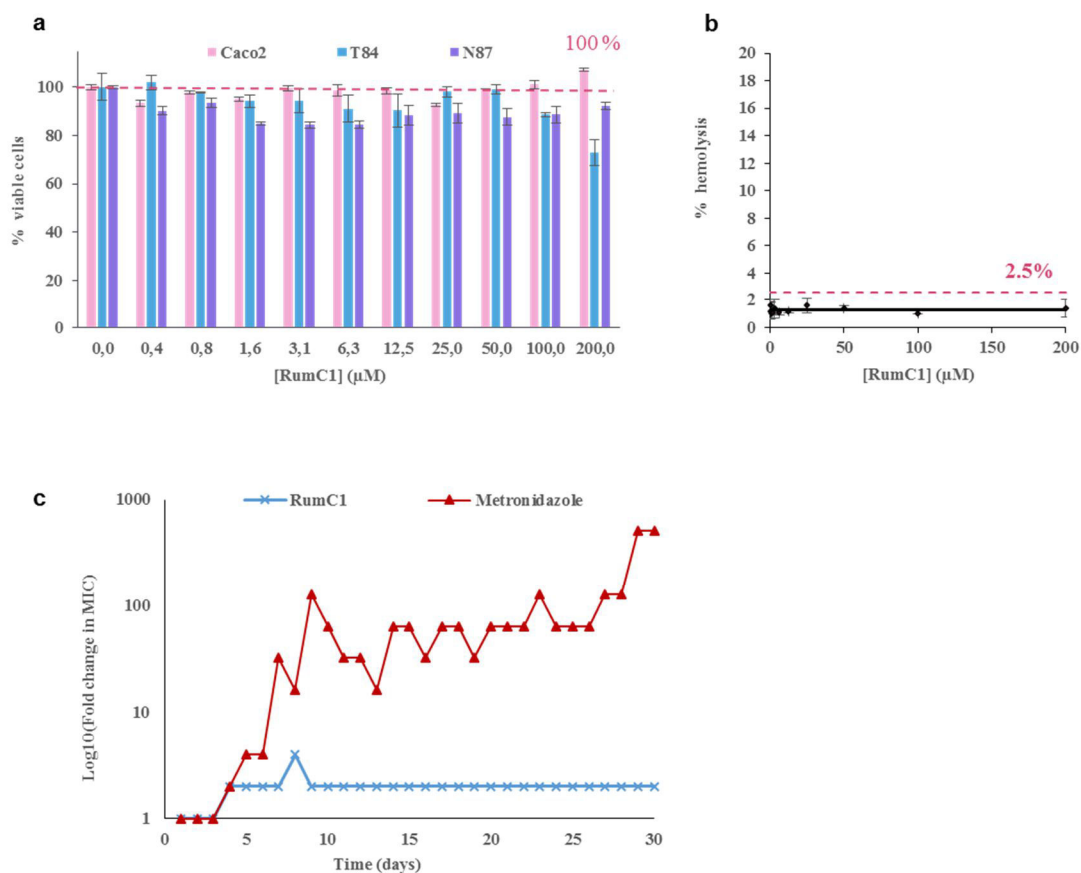


Figure 6.5 : **a** Incubation des lignées cellulaires Caco2, T84 et N87 avec RumC1. L'ajout de rézasurine et sa conversion en résofurine permet de suivre l'activité métabolique, indicatrice de viabilité cellulaire. **b** Suivi de l'activité hémolytique de RumC1 sur des érythrocytes humains. Le contrôle positif et le maximum de lyse ont été déterminés par l'incubation des érythrocytes avec du bromure de cétrimonium (CTAB). **c** Test d'induction de résistance, après trente jours d'incubation avec RumC1 ou du métronidazole (Chiumento et al., 2019).

6.3 Activité biologique des sactipeptides

Dans cette partie nous allons aborder les propriétés antimicrobiennes des sactipeptides, avec en particulier la subtilosin A, la thurincin H et la thurincin CD.

Dans le cas de la subtilosin A, une activité naturelle anti *L. monocytogenes* a été montrée pour la subtilosin A. En 2006, une étude du spectre d'activité de cette bactériocine a mis en évidence différentes propriétés (Shelburne et al., 2007). Tout d'abord la subtilosin A est particulièrement efficace contre *E. faecalis* OGX-1, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *P. gingivalis* ATCC 13408, *S. pyogenes* ATCC 19615 et *Shigella sonnei* ATCC 25931. Ce groupe comporte des bactéries à Gram positif et à Gram négatif ainsi que des bactéries aérobies et anaérobies (Tableau 6.2). L'activité

de la subtilosin A a ensuite été évaluée sur des souches de *P. gingivalis* et *K. pneumoniae* encapsulées. La présence de la capsule polysaccharidique entraîne une perte d'activité de la subtilosin A. La formation de capsules est un moyen de virulence pour de nombreuses bactéries, ce qui limite le potentiel thérapeutique de la subtilosin A (Shelburne et al., 2007). D'autre part pour déterminer l'effet des protéases produites par certaines souches sur la subtilosin A, des tests d'activités ont été menés sur des mutants de *P. gingivalis* n'exprimant pas les protéases spécifiques des lysines et des arginines. L'hypothèse étant que ces protéases peuvent être impliquées dans la dégradation de la subtilosin A et donc dans l'apparition de résistance. Les résultats obtenus ne montrent pas de valeurs de MIC significativement différentes pour la subtilosin A par rapport aux souches mères ce qui indique que cette bactériocine est résistante aux protéases.

Bacteria	MIC of subtilosin (mg/L) (n = 8)	Capsule formation (µm) (SD) (n = 20)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	>200	0.0
<i>E. faecalis</i> OGX-1	3.125	0.0
<i>E. coli</i> ATCC 8739	100	1.2 (0.1)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	>200	0.0
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	12.5	0.0
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	3.125	0.0
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 KDP129 **	3.125	ND
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 KDP133 **	6.25	ND
<i>P. gingivalis</i> W83 *	>100	0.9 (0.1)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	50	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	100	ND
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 4352 *	>200	1.3 (0.2)
<i>K. pneumoniae</i> UMN1 *	>200	1.5 (0.1)
<i>K. pneumoniae</i> UMN5	1.25	0.0
<i>K. pneumoniae</i> UMN3 *	5.0	0.3 (0.1)
<i>K. pneumoniae</i> UMN4 *	25.0	0.5 (0.1)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	>200	ND
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	>200	ND
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	1.25	0.0
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13408	1.25	ND
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	>200	ND
<i>Salmonella enterica</i> Typhi ATCC 12048	>200	ND
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	1.25	ND
<i>S. gordonii</i> Challis ATCC 49818	83.25	ND
<i>S. sonnei</i> ATCC 25931	1.25	ND

Tableau 6.2 : MIC de la subtilosin A contre une sélection de bactéries. SD : Déviation standard, ND : Non déterminée, * : souches encapsulées, ** : souches mutées pour les protéases (Shelburne et al., 2007).

Une étude de mutagenèse dirigée de la subtilosin A a montré que l'activité antimicrobienne pouvait être altérée par des mutations ponctuelles. Par exemple la mutation de la thréonine en position six par une isoleucine augmente l'effet antimicrobien de la subtilosin A. Cependant, ce mutant présente une activité hémolytique importante non présente avec la subtilosin A sauvage. Le simple changement d'un acide aminé hydrophile par un acide aminé hydrophobe, ne modifie pas la charge positive globale du peptide mais uniquement son hydrophobicité, augmentant ainsi son affinité pour les érythrocytes humains (Huang et al., 2009).

Une autre étude montre que la subtilosin A possède un effet spermicide. Cette propriété associée à l'activité antibactérienne est extrêmement intéressante car en plus de prévenir une grossesse non voulue, cela permettrait de lutter contre la propagation des infections sexuellement transmissibles. Cependant la subtilosin A, contrairement à la lacticin 3147, n'a pas d'effet sur la mobilité du sperme, une propriété primordiale pour son utilisation en tant que contraceptif (Silkin et al., 2008).

La thurincin H, comme la subtilosin A, possède un spectre d'inhibition large mais uniquement contre des bactéries à Gram positif (Tableau 6.3). Ce sactipeptide a aussi été utilisé contre neuf virus différents et dix souches fongiques mais n'a montré aucune activité, bien qu'il ait été observé un effet avec certaines souches de *Bacillus*. Par exemple la souche *B. thuringiensis* SF361, productrice de la thurincin H, produit un autre composé YvgO qui est une protéine antifongique (Wang et al., 2014b).

Strains	Medium	Incubation (h)	Temp (°C)	MIC	
				(µg/mL)	(nM)
<i>Bacillus cereus</i> F4552	TSB	12	37	1,70	0,54
<i>Bacillus cereus</i> F4810	TSB	12	37	1,70	0,54
<i>Bacillus cereus</i> Northland	TSB	12	37	4,70	1,50
<i>Bacillus cereus</i> Norhview P2E018	TSB	12	37	7,05	2,25
<i>Bacillus licheniformis</i>	TSB	12	37	68,75	21,90
<i>Bacillus megaterium</i> LRB89	TSB	17	37	0,44	0,14
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6537	TSB	14	37	4,60	1,47
<i>Bacillus subtilis</i> CU1065(WT)	TSB	17	37	36,94	11,77
<i>Bacillus subtilis</i> LRB90	TSB	14	37	9,23	2,94
<i>Bacillus subtilis</i> LRB91	TSB	14	37	2,31	0,73
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	TSB	14	37	1,15	0,37
<i>Bacillus thuringiensis</i> SF361	TSB	12	37	18,44	5,87
<i>Bacillus thuringiensis</i> EG10368	TSB	12	37	0,85	0,27
<i>Carnobacterium piscicola</i> CU216	APT	12	30	0,88	0,28
<i>Enterobacter agglomerans</i> J-1	TSB	12	37	-	-
<i>Enterococcus mundtii</i> EM	TSB	12	37	68,75	21,90
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ATCC 12980	TSB	24	50	0,88	0,28
<i>Listeria innocua</i> ATCC 2283	TSB	17	37	0,88	0,28
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	TSB	12	37	0,88	0,28
<i>Listeria monocytogenes</i> F2 586 1053	TSB	17	37	1,76	0,56
<i>Listeria monocytogenes</i> 2289	TSB	17	37	1,76	0,56
<i>Paenibacillus larvae</i> subsp <i>larvae</i> ATC 25747	TSB	12	37	-	-
<i>Pseudomona syringae</i> pv. <i>papulans</i> 51	TSB	12	37	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 9144	TSB	14	37	36,94	11,77
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 8095	TSB	14	37	18,44	5,87
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 8043	TSB	12	37	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> G1-166 (03:k6)	TSB	12	37	-	-

Tableau 6.3 : MIC de la thurincin H contre les bactéries sélectionnées (Wang et al., 2014b).

Une étude de l'efficacité de la thurincin CD contre dix-neuf souches de *C. difficile* a été réalisée. Cette étude compare l'activité de ce sactipeptide avec d'autres agents antibactériens : le métronidazole, la vancomycine, la ramoplanin et l'actagardine (un lanthipeptide). La thurincin CD possède la MIC la plus basse pour six de ces souches, dont deux souches extrêmement virulentes, CD 196 R027 (250 nM) et R20291 027 (125 nM). La MIC moyenne contre ces souches est de 208 nM. Un autre point intéressant est que l'activité de la thurincin CD est augmentée quand elle est associée avec la ramoplanin ou la vancomycine. Ceci confirme l'importance de combiner les peptides antimicrobiens et les antibiotiques disponibles sur le marché afin de trouver de nouveaux traitements, en particulier contre les souches déclarées prioritaires (Mathur et al., 2013). Dans ce sens, une étude sur la thurincin CD et cinq antibiotiques a été réalisée pour évaluer le potentiel de ces agents antibactériens sur l'inhibition de biofilm produit par différentes souches de *C. difficile*. Le résultat principal est que chaque souche de *C. difficile* produit un biofilm différent et

présente par conséquent une sensibilité différente aux antibiotiques. Cependant, l'association de la thuricin CD avec la rifampicine conduit à une réduction plus importante du biofilm produit par *C. difficile* R027 que lorsque les deux molécules sont testées séparément. Ce résultat souligne une fois de plus que l'association de plusieurs molécules est une stratégie potentiellement intéressante pour lutter contre les souches de *C. difficile* productrices de biofilms (Mathur et al., 2016).

6.4 Etude du mode d'action de RumC1

Dans cette partie, nous présenterons les résultats préliminaires concernant le mode d'action de RumC1 sur *C. perfringens*. En effet, les travaux d'élucidation de ce mécanisme et l'identification de la cible moléculaire de RumC1 sont toujours en cours. La littérature indique que les peptides antimicrobiens présentent majoritairement un mécanisme lytique par formation de pores. Par exemple, dans le cas de la nisine, l'interaction avec le lipide II, un composant de la paroi bactérienne, entraîne la formation de pores stables dans le temps, aboutissant à une fuite du contenu intracellulaire et donc à la mort cellulaire. Pour confirmer cette interaction, des tests sur des membranes ne comportant pas de lipide II ont été réalisés, il en résulte la formation de pores de taille inférieure avec une durée de vie de seulement quelques millisecondes (Wiedemann et al., 2004). Le mode d'action par formation de pores a aussi été démontré pour les peptides antimicrobiens cycliques. La cyclisation limite le nombre de conformations possibles pour le peptide en favorisant un état amphiphile et par conséquent une insertion dans la membrane bactérienne et la formation de pores. La linéarisation de peptides cycliques engendre un plus grand nombre de conformations possibles et donc une plus faible activité antimicrobienne (Cirac et al., 2011).

Le potentiel de perméabilisation de RumC1 a été évalué en utilisant l'iodure de propidium (IP) sur *C. perfringens* traité par RumC1. L'IP est un agent fluorescent rouge, intercalant de l'ADN qui ne peut pas traverser la membrane. En solution, cet agent présente un maximum d'absorption à 636 nm et un maximum d'excitation à 493 nm. Lorsqu'il est complexé à l'ADN, l'IP est vingt à trente fois plus fluorescent, avec des maxima d'absorption et d'émission déplacés à 617 nm et 535 nm, respectivement. Les contrôles utilisés lors de cette expérience sont le CTAB, utilisé en tant que détergent, et la nisine, en tant que peptide antimicrobien induisant la formation de pores. Les résultats obtenus indiquent qu'une incubation de 2 h avec RumC1, n'entraîne pas d'incorporation d'IP. Dans les mêmes conditions, le traitement à la nisine conduit à 59 % de l'incorporation maximale d'IP déterminée avec le CTAB (Figure 6.6 a). Ces données ont été confirmées en utilisant un autre agent intercalant, le Sytox[®], avec un suivi par microscopie à fluorescence. Lors de cette expérience, après 15 min de traitement, RumC1 ne montre aucune perméabilisation de la membrane alors que la nisine entraîne l'incorporation d'environ 97 % de l'agent intercalant (Figure 6.6 b) (Chiumento et al., 2019).

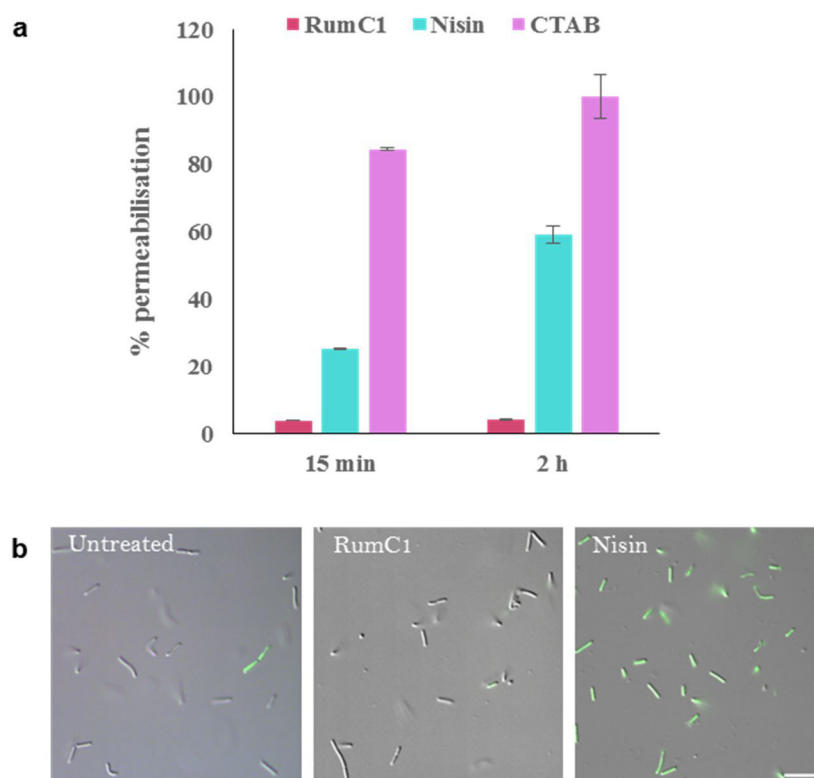
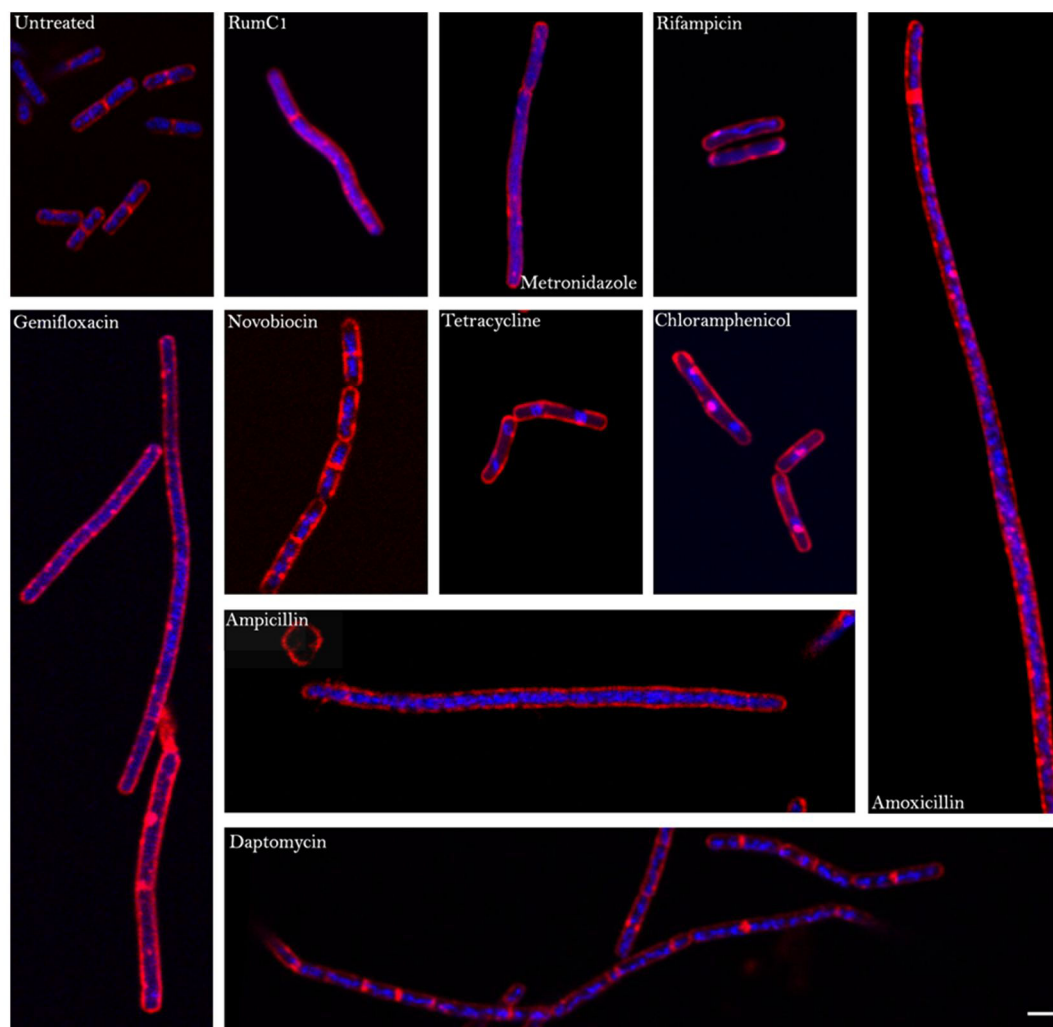


Figure 6.6 : Etude de la perméabilisation de *C. perfringens* avec RumC1. **a** Mesure d'incorporation d'IP après traitement par RumC1 et la nisine. Le maximum d'incorporation a été déterminé avec le CTAB **b** Suivi par microscopie à fluorescence de l'incorporation de Sytox[®] après traitement par RumC1 et la nisine (Chiumento et al., 2019).

Contrairement à la nisine, RumC1 ne s'insère pas dans la membrane bactérienne pour induire la formation de pores. Ceci a été confirmé par l'étude de l'interaction de RumC1 sur une monocouche lipidique composée d'extrait lipidique de *C. perfringens* et reconstituée à l'interface air-eau. L'action de RumC1 sur cette surface ne montre aucun changement de pression de surface contrairement à la nisine et du CTAB (Chiumento et al., 2019). De ce fait, RumC1 a très probablement un mécanisme d'action différent de celui des bactériocines actives contre les bactéries à Gram positif et pourrait avoir une cible intracellulaire conduisant à la mort de la bactérie. Généralement les bactériocines ayant une cible intracellulaire sont plus spécifiques des bactéries à Gram négatif et présentent un spectre d'action réduit. Des RiPPs de la famille des thiopeptides ont montré une inhibition de la traduction. Par exemple la nocathiacin I, produit par *Amycolatopsis* sp. MJ347-81F4, a pour cible la sous-unité ribosomale 50S (Bagley et al., 2005).

Afin de déterminer le mode d'action de RumC1, la méthode *Bacterial Cytological Profiling* a été adaptée à des conditions anaérobies (Nonejuie et al., 2013). Cette méthode consiste à comparer le phénotype d'une bactérie traitée par un antibiotique au mécanisme inconnu, ici RumC1, au phénotype obtenu avec un

antibiotique dont la cible moléculaire est connue. Les membranes et l'ADN de *C. perfringens* ont été respectivement marqués au FM4-64FX et au DAPI avant analyse par microscopie confocale. Le traitement de *C. perfringens* par RumC1 aboutit à un léger allongement de la bactérie et à une modification de l'état de condensation de l'ADN. Aucune similarité morphologique n'a été observée avec des bactéries traitées par des inhibiteurs de la synthèse de la membrane, de la traduction, ou des molécules provoquant la perte du potentiel membranaire. Cependant lorsque *C. perfringens* est traité avec du métronidazole, un inhibiteur de la synthèse d'acide nucléiques, on retrouve un morphotype similaire à celui du traitement par RumC1 (Figure 6.7). Actuellement, la cible moléculaire du métronidazole n'est pas clairement identifiée. Cependant, des études suggèrent qu'il n'interagit pas directement avec la synthèse de l'ADN ou ses systèmes de réparation, mais perturbe l'équilibre rédox cellulaire aboutissant à l'inhibition de la ribonucléotide réductase et donc bloquant la synthèse de dNTP (Dingsdag and Hunter, 2018). A ce stade, nous pouvons proposer que RumC1 inhibe la synthèse d'acide nucléique d'une manière comparable à celle du métronidazole (Chiumento et al., 2019).



Mode of action	Antibiotics	Length	DNA (C/U)	Filament formation (Y/N)
Control		x 1	C	Not more than 2 cells
Inhibition cell wall synthesis	Amoxicillin	x 14-20	C	N
	Ampicillin	x 5-14	C	N
Inhibition DNA synthesis	Novobiocin	x 1	Hyper C	Y
	Gemifloxacin	x 2-9	U	Y and N
Inhibition RNA synthesis	Rifampicin	x 1-2	50 % hyper C / 50 % U	N
Inhibition protein synthesis	Tetracyclin	x 1-2	Hyper C, circular, 1-3	N
	Chloramphenicol	x 1-4	distinct molecules/cell	N
Loss membrane potential	Daptomycin	x 0,25-4	C	Y
Nucleic acid synthesis	Metronidazole	x 1-4	U with few C spots	Y
				- 2-4 short cells
				- 1 short + 1 long
				- 2 shorts + 1 long in the middle

Figure 6.7 : Bacterial Cytological Profiling contre *C. perfringens*. **a** Imagerie confocale de *C. perfringens* traité ou non aux antibiotiques. Echelle de taille = 2 µm. **b** Description des phénotypes observés en **a** : C = condensé, U = non condensé, Y = oui, N = non (Chiumento et al., 2019).

6.4.1 Exemples de modes d'action pour les sactipeptides

La subtilosin A est un sactipeptide cyclique présentant trois ponts thioéther. Comme mentionné précédemment, la cyclisation confère à ce peptide une structure contrainte essentielle à son activité. La subtilosin A ne présentant qu'une lysine et trois résidus acides, elle possède à pH physiologique une charge nette de -2 ce qui favorise une interaction avec les membranes bactériennes anioniques. De plus, son caractère amphiphile permet une interaction avec la partie hydrophobe des phospholipides. La subtilosin A présente donc des propriétés suggérant une interaction avec les phospholipides membranaires bactériens. Une étude menée en 2005 a démontré que la subtilosin A est capable d'interagir avec la bicouche lipidique et que cette interaction est modulée par la composition lipidique de la membrane. L'insertion dans la membrane de la subtilosin A, et une perturbation de la bicouche lipidique entraînant une perméabilisation de la membrane, ont été mise en évidence lorsque la concentration de ce peptide augmente (10 fois la MIC). A cette concentration, le peptide présente un état multimérique. A ce jour, l'interaction de la subtilosin A avec des composants protéiques (récepteurs, transporteurs) de la membrane bactérienne, potentiellement à l'origine de son activité, n'a pas été étudiée (Thennarasu et al., 2005).

La thuricin CD entraîne une dépolarisation de la membrane conduisant à une diminution de la taille cellulaire et de la granularité, des phénomènes identiques à ceux de la nisine et de la lacticin 3147. L'étude du mode d'action de la thuricin CD sur une souche de *Bacillus firmus* met en évidence une action individuelle des deux composantes Trn- α et Trn- β . En effet, une dépolarisation de la membrane a été observée pour les deux peptides, suggérant fortement qu'ils agissent en synergie. Ce phénomène de synergie entre deux composants a aussi été observé pour la lacticin 3147. Les deux peptides (Trn- α et Trn- β) étant très hydrophobes, ils pourraient, à l'instar de la subtilosin A, interagir avec la membrane bactérienne déstabilisant sa structure globale. Il a été proposé que l'activité lytique de la thuricin CD soit due à l'insertion de ce sactipeptide dans la membrane bactérienne, entraînant la formation de pores et un flux d'ions à travers la membrane, aboutissant à la dépolarisation de la membrane et à la mort cellulaire. (Mathur et al., 2017).

Pour terminer cette partie, le dernier sactipeptide dont le mode d'action a été étudié est la thurincin H. Une étude en utilisant des agents intercalants fluorescents a été menée afin de déterminer si la thurincin H induisait la formation de pores. Un mélange de SYTO 9 (agent fluorescent vert) et d'IP a été ajouté à des bactéries traitées par la thurincin H. Ensuite le rapport vert/rouge du signal de fluorescence a été mesuré, la diminution de ce dernier indiquant l'altération de la membrane bactérienne (une rentrée d'IP). A haute concentration (256 fois la MIC), ce ratio n'est pas modifié après traitement à la thurincin H alors que l'on a une diminution de la viabilité cellulaire de 99,99 %, démontrant que la thurincin H n'entraîne pas la formation de pores (Figure 6.8). A titre d'exemple, la nisine

engendre une altération de la membrane cellulaire qui est concomitante à la diminution de la viabilité cellulaire (Figure 6.8) (Wang et al., 2014c). A ce jour le mécanisme primaire de la thurincin H n'a pas été complètement élucidé, mais à l'instar des résultats que nous avons obtenu avec RumC1, la thurincin H ne déstabilise pas la membrane cellulaire.

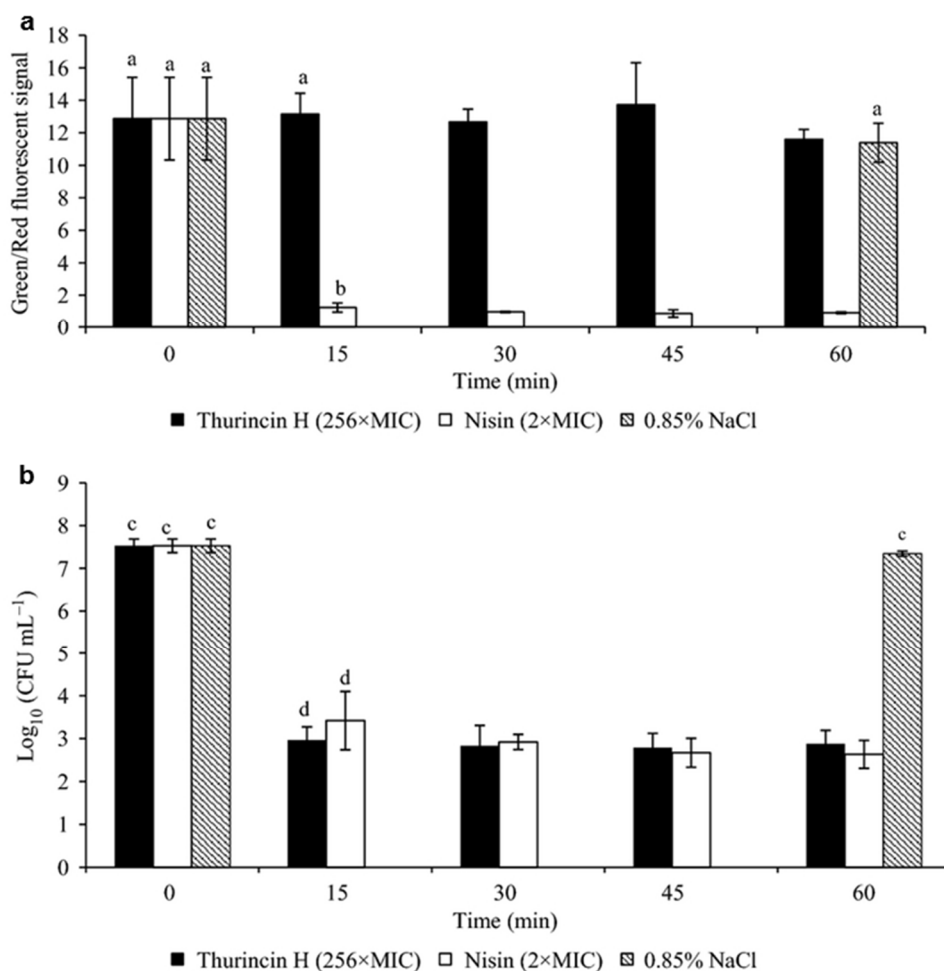


Figure 6.8 : Etude de la perméabilisation de *Bacillus cereus* par la thurincin H. **a** Mesure du rapport de la fluorescence vert/rouge après traitement à la thurincin H et à la nisine. **b** Suivi de la viabilité cellulaire lors du traitement à la thurincin H et à la nisine. Le traitement à 0,85 % NaCl est le contrôle (Wang et al., 2014c).

6.5 Conclusions sur l'étude de l'activité biologique de RumC1

Nous avons vu que RumC1 possède une activité antimicrobienne intéressante et que ce peptide ne présente pas d'effet cytotoxique sur les lignées eucaryotes Caco2, T84 et N87. La compréhension du mode d'action de RumC1 est une étape essentielle dans l'étude de l'activité biologique. Nous avons mis en évidence que RumC1 n'induit pas la formation de pores, que son effet sur *C. perfringens* entraîne un phénotype similaire à celui observé avec le métronidazole et nous proposons que RumC1 module la synthèse des acides nucléiques. Cependant il est important de

rappeler que l'un des atouts des peptides antimicrobiens est qu'ils perturbent plusieurs voies métaboliques, une propriété qui limite le développement de résistance.

Les travaux en cours concernent notamment l'étude des autres activités biologiques potentielles de RumC1 telles que l'effet anti-inflammatoire, antitumoral, antifongique, anti-biofilm ou antiviral. Un autre volet des travaux vise à identifier la (les) cible(s) moléculaires de RumC1 afin d'élucider plus précisément son mode d'action.

Conclusion générale et perspectives

La résistance aux molécules antibactériennes est un phénomène naturel permettant aux bactéries de se développer dans un écosystème donné. L'augmentation de la fréquence d'apparition des bactéries résistantes est directement liée à l'activité humaine, avec en particulier une mauvaise utilisation des molécules actuelles. La résistance aux antibiotiques est aujourd'hui l'une des plus graves menaces pour la santé humaine. Afin de contrer cette menace, il est nécessaire de mobiliser des moyens humains et financiers pour le développement de nouveaux traitements antibactériens. Cependant, la réponse apportée ne repose pas uniquement sur la communauté scientifique, une prise de conscience au niveau mondial doit avoir lieu sur l'utilisation des antibiotiques. Seule la combinaison de ces deux facteurs pourrait limiter le développement et la propagation de résistance.

Afin de répondre à ce challenge important, nous avons évoqué des pistes potentielles avec les vaccins, la phagothérapie ou les peptides antimicrobiens. Ces derniers présentent des caractéristiques intéressantes, telles que le spectre d'activité antimicrobienne, la capacité à inhiber des biofilms ou encore le faible taux d'apparition des résistances. Ces caractéristiques en font des candidats sérieux à l'utilisation en tant qu'agents antimicrobiens. Outre cette propriété, certains peptides présentent d'autres activités biologiques. Par exemple, la subtilosin A possède un effet spermicide. On peut également citer la duramycin, qui a été évaluée contre la mucoviscidose et la labyrynthopeptin qui présente un effet anti allodynie (Jones and Helm, 2009; Meindl et al., 2010). Concernant la famille des cyanobactines, certaines d'entre elles possèdent un effet anti-tumoral, antiviral ou anti-protéase en plus de l'activité antibactérienne (Donia and Schmidt, 2010; Houssen and Jaspars, 2010). Le thiostrepton A, un thiopeptide, présente un effet antimalaria en perturbant la biosynthèse des protéines impliquées dans l'apicoplaste, organe vital du parasite *Plasmodium falciparum* (McConkey et al., 1997; Schoof et al., 2010). Le même thiopeptide a montré une induction de l'apoptose sur des cellules cancéreuses (Bhat et al., 2009). Dans le cas des peptides lassos on peut mentionner la siamycin I et la siamycin II qui possèdent un effet anti VIH (Lin et al., 1996; Yano et al., 1996).

Le but des travaux présentés dans ce mémoire, était de produire, de caractériser et d'évaluer biologiquement les bactériocines RumC, des peptides antimicrobiens produits par *R. gnavus* E1 une bactérie du microbiote intestinal humain. Des travaux antérieurs, réalisés par nos collaborateurs, ont identifié le régulon responsable de la biosynthèse des bactériocines RumC et mis en évidence les gènes codant pour les pré-bactériocines RumC1-5 et les deux enzymes RumMc1-2. La présence de ces enzymes, appartenant à la famille radical-SAM, et les premières analyses par spectrométrie de masse des peptides produits par *R. gnavus* E1, suggéraient fortement que les bactériocines RumC étaient des sactipeptides. Pour

confirmer cette hypothèse nous avons développé un système d'expression et de maturation hétérologue des peptides RumC sans utiliser *R. gnavus* E1, une bactérie anaérobie stricte.

Nous avons focalisé notre étude sur l'enzyme RumMc1 et le peptide RumC1. En utilisant la spectrophotométrie UV-Visible et les spectroscopies Mössbauer et RPE, nous avons clairement montré que l'enzyme RumMc1 est une enzyme radical-SAM possédant 3 centres [4Fe-4S]. 2 de ces centres sont très probablement situés dans le domaine SPASM de l'enzyme. A l'exception de SkfB qui présente un domaine Twitch, la biosynthèse des sactipeptides décrits dans la littérature implique des enzymes radical-SAM présentant un domaine SPASM. Le mécanisme de formation des ponts thioéther par ces enzymes et la possible interaction des peptides avec les centres additionnels des enzymes radical-SAM restent des points importants à élucider. Pour apporter des éléments de réponse à ces questions nous avons mis en place une collaboration avec le groupe de Marc Fontecave au Collège de France à Paris dans le but de résoudre la structure de RumMc1 en présence de son substrat par cristallographie des rayons X. Ces travaux combinés aux études par spectroscopie RPE de différents mutants des centres [4Fe-4S] additionnels de RumMc1 en présence de RumC1 visent à démontrer l'interaction du peptide avec les centres [4Fe-4S] additionnels du domaine SPASM.

L'expression et la maturation hétérologues de mRumC1 chez *E. coli* génère une population homogène de peptide mûré. Sa caractérisation par spectrométrie de masse montre clairement que RumC1 est un sactipeptide et qu'il adopte très probablement une structure originale en double épingle. Les travaux en cours, sur le volet structural, concernent l'étude par RMN d'un peptide RumC1 doublement marqué ¹³C, ¹⁵N. Outre la structure globale du peptide mûré, cette étude permettra de déterminer la stéréochimie des 4 ponts thioéther. Nous avons vu que le régulon *rumC* contient au total 5 gènes codant pour des précurseurs peptidiques (qui ont entre 84 et 94 % d'homologie de séquence) et 2 gènes codant pour deux enzymes de maturation (qui ont 98 % d'homologie). Nous avons entrepris l'expression et la maturation hétérologues de l'ensemble des peptides avec chacune des 2 enzymes radical-SAM. Le but de ces travaux est de savoir s'il existe des spécificités enzyme/substrat mais également de définir et de comparer la configuration de chaque carbone α impliqué dans un pont thioéther pour les 5 peptides RumC.

Au cours de nos travaux nous avons entrepris l'étude de l'activité biologique de RumC1 en collaboration avec le groupe de Josette Perier à l'ISM2 à Marseille. Le premier résultat est que mRumC1 ne présente pas d'activité contre *C. perfringens* lorsque la séquence leader n'est pas totalement clivée à la trypsine. De façon intéressante, la protéase RumPc, dont le gène est présent dans le régulon *rumC*, digère partiellement la séquence leader. Celle-ci génère une forme de mRumC1,

présentant les cinq acides aminés FEGSK à l'extrémité N-terminale, qui n'est pas active. Ces données ajoutées au fait que RumPc ne présente pas de peptide signal, nous permettent de proposer un schéma de maturation *in vivo* de RumC1. Dans un premier temps le peptide précurseur est modifié par RumMc1, suivi du clivage partiel du peptide leader par RumPc dans le cytoplasme bactérien. Le clivage des cinq derniers acides aminés, se fait très probablement à l'extérieur de la bactérie par la trypsine, ce qui permet alors de libérer la bactériocine active dans la lumière intestinale (Figure 8.1) (Chiumento et al., 2019). Concernant les RiPPs, la littérature indique que cette étape d'activation par deux protéases est retrouvée pour des lanthibiotiques de classe II et III (e. g. cytolysin, plantaricin W, haloduracin, lichenicidin, carnolysin et flavipeptin)(Begley et al., 2009; Booth et al., 1996; Chen et al., 2019; Holo et al., 2001; Lohans et al., 2014; McClarren et al., 2006; Völler et al., 2013). Cependant, dans le cas des lanthipeptides, les enzymes impliquées dans le clivage séquentiel du peptide leader sont exprimées par l'organisme producteur. Dans le cas de RumC1, le clivage intracellulaire par RumPc suivi de la coupure extracellulaire à la trypsine, est un parfait exemple de mutualisme entre un symbiote et son hôte, collaborant pour générer une molécule antibactérienne, comme stratégie de protection bénéfique aux deux organismes.

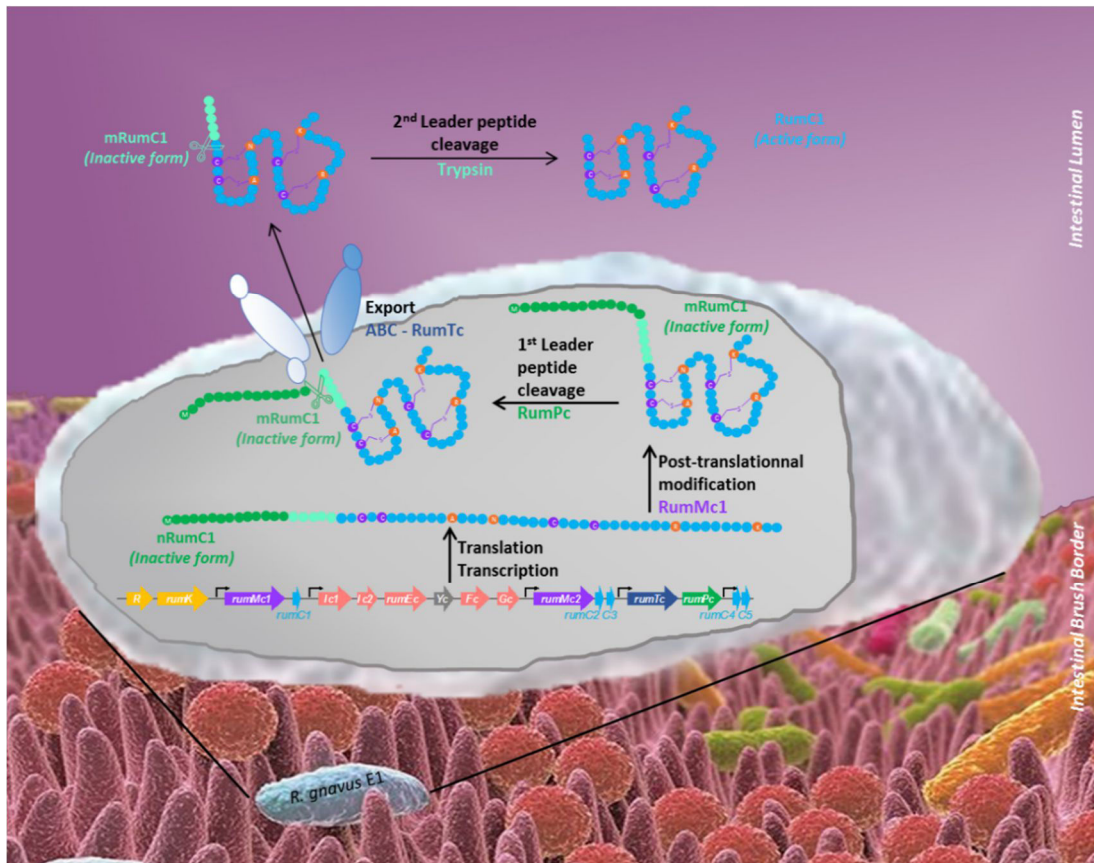


Figure 8.1 : Processus de maturation et d'activation proposé de RumC1 dans l'intestin humain. Après la transcription et la traduction du précurseur, celui-ci est modifié par RumMc1 aboutissant au peptide mûr non actif. RumPc induit un clivage partiel de la séquence leader de mRumC1. Ce peptide est ensuite exporté dans la lumière intestinale par RumTc où il sera clivé par la trypsine pancréatique, conduisant à RumC1 biologiquement actif (Chiumento et al., 2019).

Nous avons vu que RumC1 présente un effet antibactérien contre un large panel de bactéries à Gram positif, en particulier contre *C. difficile*, une souche classée prioritaire par le CDC. Afin de confirmer ce résultat intéressant, nous avons démarré une collaboration avec Katy Jeannot du Laboratoire de Bactériologie à Besançon, pour l'étude de l'efficacité de RumC1 sur des souches cliniques. Parmi celles-ci on peut citer *C. perfringens*, *C. difficile*, *L. monocytogenes* et MRSA.

Afin d'élargir l'étude de RumC1, nous avons débuté des expériences pour évaluer son efficacité sur d'autres cibles biologiques telles que, la prolifération de cellules tumorales ou la formation de biofilms par *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Enfin, nous collaborons avec le groupe de Jacques Nicoli à l'Université Fédérale du Minas Gerais au Brésil afin de déterminer l'efficacité antimicrobienne de RumC1 *in vivo* sur des souris infectées par *C. perfringens* mais également pour étudier l'impact de RumC1 sur le microbiote intestinal de la souris.

Par ailleurs, en ce qui concerne l'étude du mode d'action de RumC1, nos premiers résultats suggèrent que ce peptide perturbe la synthèse des acides nucléiques. Afin d'identifier la(les) voie(s) de biosynthèse affectée(s), nous avons prévu de suivre la synthèse d'ADN, d'ARN, de protéines et du peptidoglycane en présence de précurseurs radiomarqués après traitement ou non avec RumC1 de *C. perfringens*. Ces études seront réalisées en collaboration avec Leonora Poljak et Michelle Coddeville, du Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote à Toulouse. Dans le cas de la biosynthèse du peptidoglycane, des essais seront également réalisés avec un précurseur fluorescent, ces expériences seront effectuées en collaboration avec Patrice Polard et Nathalie Campo du Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires à Toulouse. A plus long terme, la connaissance de la cible moléculaire de RumC1 et la détermination des zones d'interactions entre les deux partenaires permettraient de concevoir des variantes de RumC1 présentant des activités biologiques optimisées.

Chapitre 7 : Matériels et méthodes

7.1 Matériel biologique

7.1.1 Les souches bactériennes

E. coli BL21(DE3)

Génotype : *F amp^T gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)λ(DE3[lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])*. Cette souche est couramment utilisée pour la surproduction de protéine dont le gène a été cloné en aval du promoteur T7. Le répresseur LacI inhibe la transcription du gène d'intérêt. Lorsqu'il est ajouté au milieu de culture l'IPTG, analogue non hydrolysable de l'allolactose, lève l'inhibition de la transcription du gène engendrée par le répresseur LacI.

E. coli TOP10

Génotype : *F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galk λ⁻ rpsL(Str^R) endA1 nupG*. Cette souche est couramment utilisée pour constituer des stocks de plasmide. Une résistance à la streptomycine est associée à cette souche.

7.1.2 Les plasmides

pETM-40-rumC1

Le vecteur pETM-40 présente un gène de résistance à la kanamycine. Au sein d'un site de clonage multiple (MCS) contenant 8 sites de restrictions, le gène de *rumC1* de *R. gnavus* E1 a été cloné entre NcoI et XhoI. Cette construction permet la production d'une protéine nommée MBP-RumC1 possédant, à l'extrémité N-terminale, une étiquette MBP suivie d'un site de coupure à la TEV. Cette construction a aussi été utilisée pour surproduire les bactériocines RumC2-5. L'expression est inductible à l'IPTG.

pET-15b-rumMc1

Le vecteur pET-15b présente un gène de résistance à l'ampicilline. Au sein d'un site de clonage multiple (MCS) contenant 5 sites de restrictions, le gène de *rumMc1* de *R. gnavus* E1 a été cloné entre NdeI et BamHI. Cette construction permet la production d'une protéine nommée RumMc1 possédant, à l'extrémité N-terminale, une étiquette de six histidines. Cette construction a aussi été utilisée pour surproduire l'enzyme RumMc2. L'expression est inductible à l'IPTG.

pET-28a(+)-rumMc1

Le vecteur pET-28a(+) présente un gène de résistance à la kanamycine. Au sein d'un site de clonage multiple (MCS) contenant 10 sites de restrictions, le gène de *rumMc1* de *R. gnavus* E1 a été cloné entre NdeI et BamHI. Cette construction

permet la production d'une protéine nommée RumMc1 possédant, à l'extrémité N-terminale, une étiquette de six histidines. Cette construction a aussi été utilisée pour surproduire l'enzyme RumMc2. L'expression est inductible à l'IPTG.

pDB1282-isc

Le vecteur pDB1282, inductible à l'arabinose, présente un gène de résistance à l'ampicilline. Ce plasmide permet la production des protéines Isc (HscA et HscB, protéines chaperonnes, la ferrédoxine Fdx, IscS, IscU, IscA), impliquées dans la biosynthèse des centres fer soufre.

PACYCDuet-1-suf

Le vecteur PACYCDuet-1 présente un gène de résistance au chloramphénicol. Ce plasmide permet la production des protéines Suf (SufA, SufB, SufC, SufD, SufS, SufE), impliquées dans la biosynthèse des centres fer soufre. L'expression des gènes *suf* est inductible à l'IPTG.

7.1.3 Les milieux de culture

Milieu LB-Miller

Ce milieu commercial (Carl Roth®) est utilisé pour les cultures bactériennes en milieu liquide et solide. Il contient 10 g/L de tryptone, 5 g/L extraits de levure et 10 g/L de chlorure de sodium (NaCl). Sa forme solide est complétée avec 15 g/L d'agar-agar (LB-Agar, Carl Roth®).

Milieu minimum M9

Ce milieu commercial (Sigma-Aldrich®) est utilisé pour les cultures bactériennes en milieu liquide. Il contient 6,8 g/L de Na₂HPO₄, 3 g/l de KH₂PO₄, 1,7 g/L de NH₄Cl et 0,8 g/L de NaCl. En début de culture, on complète le milieu avec 1 mM MgSO₄, 0,4 % glucose et 0,5 mg/L de vitamine B1.

Ce milieu peut être utilisé pour l'enrichissement en atome marqué, le ⁵⁷Fe pour la spectroscopie Mössbauer, ou le ¹³C et ¹⁵N pour les études par RMN. Dans le dernier cas le milieu est préparé de la façon suivante : 6 g/L de Na₂HPO₄, 3 g/L de KH₂PO₄ et de 1 g/L ¹⁵NH₄Cl. En début de culture, on complète le milieu avec 1 mM MgSO₄, 0,4 % glucose ¹³C et 0,5 mg/L de vitamine B1.

Milieu BHI-YH

Ce milieu commercial (Becton Dickinson®) est utilisé pour les cultures bactériennes en milieu liquide et solide. Il contient 6 g/L d'infusion cœur-cerveau, 14,5 g/L de digestion pancréatique de gélatine, 6 g/L de digestion peptique de tissu animal, 5 g/L de NaCl, 3 g/L de dextrose, 2,5 g/L de phosphate disodique. Il est complété avec 5 g/l d'extrait de levure (Becton Dickinson®), 5 mg/L d'hémine. On utilise aussi un milieu solide commercial, (Becton Dickinson®). Il contient 8 g/L

d'infusion cœur-cerveau, 16 g/L de digestion pancréatique de caséine, 5 g/L de digestion peptique de tissu animal, 5 g/L de NaCl, 2 g/L de glucose, 2,5 g/L de phosphate d'hydrogène disodique et 13,5 g/L de gélose.

7.2 Méthodes de biologie moléculaire

7.2.1 Préparation de bactéries compétentes

Toutes les étapes de ce protocole doivent être effectuées dans des conditions stériles.ensemencer 2,5 mL d'une préculture (lancée la veille) dans 100 mL de LB de façon à avoir $OD_{600} \approx 0,1$. Laisser incuber jusqu'à $OD_{600} \approx 0,5$. Après avoir incubé 10 min dans la glace, centrifuger (3000 rpm, 5 min, 4 °C). Sécher et reprendre les culots dans 10 mL de $CaCl_2$ 50 mM froid et stérile. Laisser incuber une heure dans la glace. Centrifuger à 2000 rpm, 5 min, 4 °C. Sécher et reprendre les culots dans 1,5 mL de $CaCl_2$ 0,1 M, glycérol 10 %, froid et stérile. Des aliquotes de 100 µL sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80 °C.

Le traitement par des ions divalents tels que Ca^{2+} altère la structure de la membrane bactérienne, créant des micropores qui permettent la pénétration d'ADN exogène.

7.2.2 Transformation des cellules compétentes

Simple et double transformations

50 à 75 ng du ou des plasmides d'intérêt sont ajoutés à 100 µL de bactéries compétentes, le tout est incubé 30 min à 4 °C. Effectuer un choc thermique 1 min à 42 °C au bain marie, puis incuber 2 min à 4 °C. Ajouter 300 µL de LB et incuber à 37 °C pendant une heure sous agitation (180 rpm). Après centrifugation (2000 rpm, 2 min), éliminer le surnageant, reprendre les bactéries dans 100 µL de LB et étaler la totalité sur des boîtes LB-Agar, avec l'antibiotique correspondant dilué au millième.

Triple transformations

350 à 450 ng des plasmides d'intérêt sont ajoutés à 200 µL de bactéries compétentes, le tout est incubé 30 min à 4 °C. Effectuer un choc thermique 1 min 30 sec à 42 °C au bain marie, puis incuber 2 min à 4 °C. Ajouter 300 µL de LB et incuber à 37 °C pendant deux heures sous agitation (180 rpm). Après centrifugation (2000 rpm, 2 min), éliminer le surnageant, reprendre les bactéries dans 100 µL de LB et étaler la totalité sur des boîtes LB-Agar, avec les antibiotiques correspondants dilués au deux millièmes.

Au cours de la culture, à $OD_{600} \approx 0,6$, les bactéries transformées avec trois plasmides sont aliquotées par 100 µL avec 30 % glycérol, congelées à l'azote liquide et conservées à -80 °C.

7.2.3 Insertion d'une ou plusieurs mutations par mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée permet de façon précise, l'introduction d'une ou plusieurs mutations. Cette technique est basée sur la technique de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) avec l'utilisation d'amorces simple brin. La PCR est une technique permettant l'amplification d'une séquence d'ADN à partir d'une matrice d'acides nucléiques. Elle repose sur les propriétés d'hybridation de l'ADN en fonction de la température, à 95 °C l'ADN est dénaturé et les deux brins sont séparés, permettant ainsi, en diminuant la température, l'hybridation d'amorces simple brin. L'élongation de ces dernières se fera par l'ADN polymérase, capable de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN servant de matrice. La répétition de ce cycle dénaturation/hybridation/élongation engendre une augmentation du nombre d'ADN d'intérêt de 2^n , n étant le nombre de cycles. Par l'utilisation d'amorces portant la mutation voulue, la PCR permet l'introduction de ces dernières. Les amorces ont été obtenues par synthèse d'ADN (Eurofins Genomics), elles sont notées dans le Tableau 7.1.

L'amplification est réalisée dans un volume final de 20 μ L dans lequel on ajoute à 1 μ L de la matrice ADN (10 ng/ μ L), 1,25 μ L de chacune des deux amorces (codant et non-codant) à 10 μ M, 10 μ L de Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer (New England Biolabs® Inc.). Les conditions de PCR sont indiquées dans le Tableau 7.1. La présence et la taille des produits issus de la PCR sont vérifiées sur gel d'agarose à 1 %. Le mélange PCR est ensuite digéré avec 1 μ L l'enzyme DpnI, dégradant la matrice d'ADN méthylé, pendant 1h à 37 °C. A 5 μ L du produit PCR digéré, sont ajoutés 3 μ L d'un mélange Kinase-Ligase-DpnI (KLD, New England Biolabs® Inc) pour un volume final de 10 μ L. Après 30 min à température ambiante, la totalité du mélange est utilisé pour transformer 100 μ L de cellules *E. Coli* TOP10.

Nom du plasmide	Séquences des amorces	Conditions PCR	Plasmide matriciel
pETM-40-rumC1C26A	Brin codant 5'-CAAGTGGGGT <u>G</u> CGTGTGCAGCG-3' Brin non codant 5'-CTGCCCTCGAAGTCCGCA-3'	30'' à 95°C 30'' à 68°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pETM-40-rumC1
pETM-40-rumC1C28A	Brin codant 5'-GGGTTGCGTGGC CAGCGGTAGCA-3' Brin non codant 5'-CACTTGCTGCCCTCGAAG-3'	30'' à 95°C 30'' à 67°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pETM-40-rumC1
pETM-40-rumC1C45A	Brin codant 5'-TCCGGCGTAC <u>G</u> CGTGGTTATTG-3' Brin non codant 5'-CCC GCGTTATGGCTGTTG-3'	30'' à 95°C 30'' à 64°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pETM-40-rumC1
pETM-40-rumC1C49A	Brin codant 5'-CGTGGGTTATG <u>C</u> CGG CAACAACGGTGTGG-3' Brin non codant 5'-CAGTACGCCGACCCGCG-3'	30'' à 95°C 30'' à 72°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pETM-40-rumC1
pETM-40-rumC1C26AC28A	Brin codant 5'-GGCAGCGGTAGCACCCGGTT-3' Brin non codant 5'-ACGGCACCCTTCTGCTGCCCTC-3'	30'' à 95°C 30'' à 72°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pETM-40-rumC1
pETM-40-rumC1C45AC49A	Brin codant 5'-TTATG <u>C</u> CGGCAACA ACGGTGTGTTACCC-3' Brin non codant 5'-CCCACGGC TACGCCGACCCGCGTT-3'	30'' à 95°C 30'' à 72°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pETM-40-rumC1
pETM-40-rumC1G41AP42A	Brin codant 5'-CGATAACGCGG <u>T</u> CGCGCTACTGCG-3' Brin non codant 5'-CTGTTGCAACCGCGGTG-3'	30'' à 95°C 1' 30'' à 70°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pETM-40-rumC1
pETM-40-rumC1G24AS25A	Brin codant 5'-CGATAACGCGG <u>T</u> CGCGCTACTGCG-3' Brin non codant 5'-CTGTTGCAACCGCGGTG-3'	30'' à 95°C 1' 30'' à 65°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pETM-40-rumC1
pET-15b-rumMc1 rSAM	Brin codant 5'- <u>G</u> CCCGCTATGCTATC TACAACGAACACAATGAAG-3' Brin non codant 5'-ACGCATGTTAGCCTGTTCCGTGTTCCAG-3'	30'' à 95°C 1' 30'' à 61°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pET-15b-rumMc1
pET-15b-rumMc2 rSAM	Brin codant 5'- <u>G</u> CCCGCTATGCTATCTACAACGAACACAATG-3' Brin non codant 5'-ACGCATGTTAGCCTGTTCCGTGTTCCAG-3'	30'' à 95°C 1' 30'' à 58°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pET-15b-rumMc2
pET-15b-rumMc1 AuxI	Brin codant 5'-GTGAAAACGGATGGCAAATTTCTG CTGG <u>C</u> TGAAAAAACCGGTGATGCACC-3' Brin non codant 5'-ATAGACGCGACGATT ACCCGGAATACAGGCGCGTTGCGACGAGATC-3'	30'' à 95°C 1' 30'' à 68°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pET-15b-rumMc1
pETM-40-rumC1G41AP42A	Brin codant 5'-CGATAACGCGG <u>C</u> TGCGCGTACTGCG-3' Brin non codant 5'-CTGTTGCAACCGCGGTG-3'	30'' à 95°C 1' 30'' à 70°C 3' 30'' à 72°C 25 cycles	pETM-40-rumC1

Tableau 7.1 : Séquence des amorces et conditions de PCR pour la mutagenèse dirigée. (i) Nom des plasmides portant la mutation. (ii) Amorces utilisées, avec les nucléotides portant la (les) mutation(s) soulignés. (iii) Conditions de PCR employées. (iv) Plasmide servant de matrice. Chaque cycle de PCR commence par 2 min à 95 °C et se conclue par un cycle de 10 min à 72 °C.

7.2.4 Extraction et préparation des plasmides

Les stocks de plasmides sont préparés à partir d'une souche d'*E. coli* TOP10, transformée préalablement avec un des plasmides utilisés et étalée sur milieu LB agar contenant l'antibiotique adéquat. Une colonie est mise en culture sur la nuit, à 37 °C, dans 10 mL de LB. Les cellules sont récoltées par centrifugation (10 min à 7000 rpm). Le kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) est utilisé afin de purifier les plasmides. La concentration de ces derniers est déterminée par NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

7.3 Méthodes de biochimie

7.3.1 Surexpression des protéines

En amont de chaque culture une préculture est réalisée afin de les ensemercer. Le protocole de cette dernière est identique pour chaque culture. Une colonie de bactéries transformées est inoculée dans 10 mL de milieu LB, contenant le ou les antibiotiques appropriés, à 37 °C sur la journée. 1 mL de cette préculture est ajouté à 100 mL de LB complétés avec les antibiotiques. La culture est incubée à 37 °C, 180 rpm sur la nuit.

Expression des MBP-nRumC

Après avoirensemencé 1 L de milieu M9/kanamycine, par 15 mL de préculture, les cultures sont incubées à 37 °C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,8 à 600 nm. La température est alors réduite à 25 °C, puis l'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM). Après avoir laissé la culture sur la nuit, les cellules sont récoltées (4000 rpm, 4 °C, 20 min), reprises dans le tampon A (50 mM Tris, pH8, 50 mM NaCl) puis stockées à -80 °C.

Expression des MBP-mRumC

On ajoute à 1 L de milieu M9/ampicilline/kanamycine/chloramphénicol du FeCl₃ (50 µM). Ce milieu estensemencé par 15 mL de préculture. Les cultures sont incubées à 37 °C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,8 à 600 nm. La température est alors réduite à 25 °C, puis l'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM). La culture est laissée sur la nuit en présence de FeCl₃ (100 µM) et de L-cystéine (300 µM). Les cellules sont récoltées (4000 rpm, 4 °C, 20 min) et reprises dans le tampon A et stockées à -80 °C.

Une culture en fermenteur de 12 L a été mise au point. Le protocole d'expression est identique à l'exception d'un débit d'air nécessaire à l'oxygénation du milieu (180 NL/h).

Pour l'étude par RMN, un protocole différent est utilisé. 3L de M9/ampicilline/kanamycine/chloramphénicol sont inoculés par 45 mL de préculture, en présence de FeCl₃ (50 µM). Les cultures sont incubées à 37 °C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,25 à 600 nm. Les cellules sont récoltées (4000 rpm, 4 °C, 20

min) et reprises dans un litre de M9/ampicilline/kanamycine/chloramphénicol en présence de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ et de glucose ^{13}C . Les cultures sont incubées à 25 °C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,8 à 600 nm, puis l'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM) en présence de 100 μM de FeCl_3 et 300 μM de L-cystéine. Après avoir laissé la culture sur la nuit, les cellules sont récoltées (4000 rpm, 4 °C, 20 min), reprises dans le tampon A et stockées à -80 °C.

Expression des RumMc

Après avoirensemencé 1 L de milieu M9/kanamycine ou ampicilline, par 15 mL de préculture, les cultures sont incubées à 37 °C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,8 à 600 nm. La température est alors réduite à 25 °C, puis l'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM). Après avoir laissé la culture sur la nuit, les cellules sont récoltées (4000 rpm, 4 °C, 20 min) et reprises dans le tampon B (50 mM HEPES, pH 7,5, 300 mM NaCl) et stockées à -80 °C.

Pour obtenir la forme holo- des enzymes RumMc, celles-ci sont coexprimées avec les protéines d'assemblage des centres fer-soufre, isc ou suf. Le protocole précédent diffère légèrement en fonction de la machinerie utilisée.

En présence des protéines Isc

On ajoute à 1 L de milieu M9/ampicilline/kanamycine du FeCl_3 (50 μM). Ce milieu estensemencé par 15 mL de préculture. Les cultures sont incubées à 37 °C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,3 à 600 nm. L'expression des protéines Isc est induite par l'ajout de FeCl_3 (100 μM), de L-cystéine (300 μM) et d'arabinose (20 mM). A une densité optique de 0,8 à 600 nm, la température est alors réduite à 25 °C, puis l'expression de l'enzyme de maturation est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM). Après avoir laissé la culture sur la nuit, les cellules sont récoltées (4000 rpm, 4 °C, 20 min), reprises dans le tampon B et stockées à -80 °C.

En présence des protéines Suf

On ajoute à 1 L de milieu M9/ampicilline/chloramphénicol du FeCl_3 (50 μM). Ce milieu estensemencé par 15 mL de préculture. Les cultures sont incubées à 37 °C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,8 à 600 nm. La température est alors réduite à 25 °C, puis l'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM) en présence de 100 μM de FeCl_3 et 300 μM de L-cystéine. Après avoir laissé la culture sur la nuit, les cellules sont récoltées (4000 rpm, 4 °C, 20 min), reprises dans le tampon B et stockées à -80 °C.

Pour l'analyse en spectroscopie Mössbauer, une solution de ^{57}Fe est utilisée à la place du FeCl_3 . Celle-ci est préparée à partir de $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$ dissous dans un mélange HCl/HNO₃ (50 %/50 %).

Expression de la protéase TEV (*Tobacco Etch Virus*)

Après avoirensemencé 1 L de milieu LB/kanamycine, par 15 mL de préculture, la culture est incubée à 37 °C jusqu'à atteindre une densité optique de 0,5 à 600 nm. La température est alors réduite à 20 °C, puis l'expression des protéines est induite par l'ajout d'IPTG (1 mM). La culture est laissée sur la nuit, les cellules sont récoltées (4000 rpm, 4 °C, 20 min), reprises dans le tampon C (25 mM Tris, pH8, 500 mM NaCl, 15 mM imidazole, 10 % glycérol) et stockées à -80 °C.

7.3.2 Purification des protéines

La lyse bactérienne est réalisée par sonication. Au préalable, une pastille anti-protéase est ajoutée (cOplete™, EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets, Roche) pour 50 mL de culture. Après la sonication, les débris cellulaires sont séparés de la fraction soluble par ultracentrifugation (40 000 rpm, 4 °C, 40 min, exceptée pour la TEV : 30 000 rpm, 4 °C, 45 min). Au cours des différents protocoles de purification, la pureté des fractions d'intérêt est évaluée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE.

nRumC et mRumC

Que les peptides RumC soient coexprimés avec une des enzymes de maturation ou non, le protocole de purification est identique. Programme de sonication : 10 min total (10 s ON/10 s OFF), amplitude 60 %. Le surnageant est injecté sur deux colonnes MBP en série (MBPTrap™ HP 5 mL, GE Healthcare) préalablement équilibrées en tampon A. Après plusieurs lavages, la construction MBP-RumC est éluée par le tampon D (50 mM Tris, pH8, 50 mM NaCl, 40 mM maltose). Les fractions contenant MBP-RumC sont rassemblées et concentrées (30,000 MWCO filter in Amicon® Ultra centrifugal filter devices). Afin d'éliminer l'étiquette MBP, l'échantillon est digéré à la protéase TEV, avec un ratio final TEV/MBP-RumC de 1:20 en masse, pendant 30 min à température ambiante. L'étiquette MBP, la TEV et RumC sont séparés par chromatographie d'exclusion de taille (HiLoad 16/60 Superdex® 75 prep grade column, GE Healthcare) équilibrée en tampon E (50 mM HEPES, pH 7,5, 100 mM NaCl). Les fractions contenant RumC sont concentrées et stockées à -80 °C. La concentration est déterminée par spectroscopie UV-vis.

Pour purifier les 12 L de culture en fermenteur, le protocole de purification des peptides RumC a été adapté. Les étapes de sonication et de centrifugation sont réalisées dans les mêmes conditions. Concernant l'étape de chromatographie d'affinité, les colonnes MBP prépaquées de 5 mL ont été remplacées par une colonne XK26 contenant 25 mL de résine dextrine sepharose. Pour tenir compte de ce changement, les débits et volumes injectés ont été multipliés par 2,6. Les conditions de digestion à la TEV sont identiques. La superdexS75 16/60 de 120 mL a été remplacé par une colonne préparative superdexS75 26/600 de 320 mL permettant de faire deux injections pour purifier les 12 L de culture.

Purification des protéines RumMc

Forme apo

Programme de sonication : 10 min total (10 s ON/10 s OFF), amplitude 60 %. Le surnageant est chargé sur une colonne Ni-NTA (*Nickel-Nitriloacetic Acid*, HisTrap™ HP 5mL GE Healthcare) préalablement équilibrée en tampon A. Après plusieurs lavages de la colonne, RumMc est élué par le gradient de 0 % à 50 % de tampon F (50 mM Tris, pH8, 50 mM NaCl, 1M Imidazole). Les fractions contenant RumMc sont rassemblées et concentrées (30,000 MWCO filter in Amicon® Ultra centrifugal filter devices). Le mélange est laissé à 4 °C sur la nuit en présence de dithionite (10 mM) et d'EDTA (5 mM). La dernière étape de purification est une chromatographie par exclusion de taille. Le mélange est injecté sur Superdex S200 (HiLoad 16/60 Superdex 200pg 120 mL, GE Healthcare), préalablement équilibrée en tampon E. Les fractions contenant RumMc sont rassemblées, concentrées et stockées à -80 °C. La concentration est déterminée par spectroscopie UV-vis.

Forme holo

Programme de sonication : 10 min total (10 s ON/10 s OFF), amplitude 60 %. Le surnageant est chargé sur une colonne Ni-NTA (*Nickel-Nitriloacetic Acid*, HisTrap™ HP 5mL GE Healthcare) préalablement équilibrée en tampon A. Après plusieurs lavages de la colonne, RumMc est élué par le gradient de 0 % à 50 % de tampon F (50 mM Tris, pH8, 50 mM NaCl, 1M Imidazole). Les fractions contenant RumMc sont rassemblées et concentrées (30,000 MWCO filter in Amicon® Ultra centrifugal filter devices). Le mélange est laissé à 4 °C sur la nuit en présence de dithionite (10 mM) et d'EDTA (5 mM). La dernière étape de purification est une chromatographie par exclusion de taille. Le mélange est injecté sur Superdex S200 (HiLoad 16/60 Superdex 200pg 120 mL, GE Healthcare), préalablement équilibrée en tampon E. Les fractions contenant RumMc sont rassemblées, concentrées et stockées à -80 °C. La concentration est déterminée par spectroscopie UV-vis.

Purification de la TEV

Programme de sonication : 10 min total (5 s ON/10 s OFF), amplitude 20 %. Le surnageant est chargé sur deux colonnes Ni-NTA (*Nickel-Nitriloacetic Acid*, HisTrap™ HP 5mL GE Healthcare) préalablement équilibrées en tampon H (25 mM Tris, pH8, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole, 10 % glycérol). La TEV est éluée avec un gradient de 0 à 100 % de tampon I (25 mM Tris, pH8, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, 10 % glycérol). Les fractions les plus pures sont rassemblées puis dialysées sur la nuit contre 5 L de tampon J (50 mM Tris, pH8, 150 mM NaCl, 1 mM DTT). A ce stade, il est possible de voir un précipité blanc, dans ce cas centrifuger (4000 rpm, 10 min). On ajoute 10 % de glycérol final à l'échantillon. La concentration est déterminée par spectroscopie UV-vis. Les échantillons sont conservés à -80 °C.

7.3.3 Données des protéines

Les concentrations de protéines ont toutes été déterminées par spectrophotométrie UV-vis en utilisant les données regroupées dans le Tableau 7.2.

MBP-RumC1	$\epsilon = 76320$	MM = 49672,0	RumC1	$\epsilon = 8480$	MM = 6723,5
MBP-RumC2	$\epsilon = 70820$	MM = 49697,1	RumC2	$\epsilon = 2980$	MM = 6748,6
MBP-RumC3	$\epsilon = 70820$	MM = 49702,1	RumC3	$\epsilon = 2980$	MM = 6753,6
MBP-RumC4	$\epsilon = 72310$	MM = 49937,3	RumC4	$\epsilon = 4470$	MM = 6988,8
MBP-RumC5	$\epsilon = 70820$	MM = 49662,1	RumC5	$\epsilon = 2980$	MM = 6339,2
RumMc1	$\epsilon = 73266$	MM = 58606	RumMc2	$\epsilon = 72800$	MM = 58765
TEV	DO = 1,19 à 1 mg/mL		RumPc	$\epsilon = 52425$	MM = 42791,8

Tableau 7.2 : Paramètres des différentes protéines utilisés. Le coefficient d'extraction molaire ϵ en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ en et la masse molaire en $g \cdot mol^{-1}$.

7.3.4 Production et purification de la SAM

Production de la SAM

La synthèse de la SAM se déroule à 4 °C. Dans un ballon de 100 mL on ajoute : 10 mL Tris 0,5 M pH8, 31,5 mL d'eau, 414 mg d'ATP, 75 mg de méthionine, 187 mg de KCL, 750 μ L de $MgCl_2$ 2 M, 3,5 mL de β -mercaptoéthanol et 50 μ L de pyrophosphatase. La réaction est initiée par l'ajout de 500 μ L d'extraits bruts de SAM synthétase. Le suivi de la réaction se fait par HPLC. Après 21 h de réaction, on arrête la réaction par l'ajout d'HCl (pH<5). Le mélange réactionnel est dilué 5 fois avec un tampon AcONa pH 5 puis congelé et conservé à -20 °C.

Purification de la SAM

L'extrait brut est chargé sur une colonne CM52 (échangeuse de cation) équilibrée à 1 mL/min en tampon AcONa pH 5. La SAM est éluée avec 40 mM H_2SO_4 . Les fractions obtenues sont analysées par HPLC et celles correspondant à la SAM sont rassemblées puis lyophilisées. Le lyophilisat repris dans 10 mL d'eau est injecté sur une colonne équilibrée avec un Bio-Gel P-2 (33 g dans 100 mL d'eau). Les fractions obtenues sont analysées par HPLC et celles correspondant à la SAM sont rassemblées puis lyophilisées. Le lyophilisat est repris dans de l'eau puis des aliquotes sont conservées à -80 °C.

7.3.5 Reconstitution des centres [4Fe-4S] en anaérobie

Les centres [4Fe-4S] des protéines RumMc, purifiées sous forme apo, sont reconstitués en boîte à gants sous atmosphère contrôlée ($[O_2] < 2$ ppm). La

concentration de la protéine reconstituée est ajustée à 100 μM dans le tampon E. Sont ajoutés à l'échantillon : 5mM DTT, 1,5 mM de Fe^{2+} (Sel de Mohr : $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 1,5 mM de L-cystéine et 2 μM de cystéine désulfurase CSDA d'*E. coli*. La reconstitution des centres [4Fe-S] est suivie par spectroscopie UV-visible en boîte à gants. Lorsque l'on atteint le rapport $\text{DO}_{420}/\text{DO}_{280} \approx 0,3$, la réaction est arrêtée. Afin d'éliminer les molécules de faibles poids moléculaires, le mélange réactionnel est passé sur une colonne NAPTM Column, NAP-10 équilibrée dans le tampon E. La protéine RumMc reconstituée est concentrée (30,000 MWCO filter in Amicon[®] Ultra centrifugal filter devices). La concentration est déterminée par spectroscopie UV-vis et les aliquotes sont conservées à $-80\text{ }^\circ\text{C}$.

Lorsque les échantillons sont analysés par spectroscopie Mössbauer, une solution de ^{57}Fe est utilisée à la place du Sel de Mohr. La reconstitution des centres [4Fe-4S] est réalisée avec un protocole identique. La solution de ^{57}Fe est préparée à partir de $^{57}\text{Fe}_2\text{O}_3$ dissous dans un mélange HCl/ HNO_3 (50 %/50 %).

7.3.6 Dosage du fer

La quantité de fer est déterminée par la méthode de Fish (Fish, 1988). Une solution de Fe^{2+} (Sel de Mohr) à 10 mM, est préparée dans de l'HCl 1N. Une dilution au 20^{ème} permet d'obtenir la solution de référence à 500 μM . A partir de cette solution sont préparés des standards contenant 0, 2, 4, 6, 8, 10 et 20 nmoles de fer dans un volume final de 65 μL (1 μL = 0,5 mol de fer). De façon parallèle des solutions protéiques sont préparées dans un volume final de 65 μL . L'ensemble des échantillons et standards sont traités de la manière suivante. Incubation avec 45 μL d'acide perchlorique 1 M pendant 15 min. A 90 μL de ces échantillons sont ajoutés 72 μL de bathophénantroline disulfonate (1,7 mg/mL), 36 μL d'ascorbate de sodium (38 mg/mL) et 27 μL d'acétate de sodium (solution saturée diluée trois fois). Après 30 min d'incubation, on lit l'absorbance à 537 nm. La droite étalon permet de déterminer la quantité de fer par monomère d'enzyme.

7.3.7 Test d'alkylation des cystéines

A une solution de MBP-RumC1, est ajoutée une solution de bicarbonate d'ammonium à une concentration finale de 100 mM. Ce mélange est complété par du DTT à 5 mM final puis incubé 35 min à $55\text{ }^\circ\text{C}$. Afin d'alkyler les cystéines libres, on ajoute du iodoacétamide à une concentration finale de 14 mM. La solution est incubée 30 min dans le noir. La réaction est arrêtée par un nouvel ajout de DTT à 5 mM final puis incubée pendant 15 min dans le noir. Après purification du peptide RumC1, ce dernier est analysé par spectrométrie de masse.

7.3.8 Tests d'activités de l'enzyme RumMc1

Le protocole des tests d'activité de l'enzyme RumMc1 sur la prébactériocine nRumC1 a évolué au cours des trois ans de thèse. Les premiers tests ont été réalisés

dans un volume final de 200 μL à 37 °C pendant 6 h, avec un rapport RumMc1/RumC1 de 1/1 en molaire, dans le tampon E. Les tests aboutissant à la maturation complète de RumC1 ont été réalisés sur une durée de 3 h 30 min et dans un rapport 1/4 en molaire. Le mélange réactionnel est alors analysé en parallèle par spectrométrie de masse et HPLC.

	RumMc1	nRumC1 (ou wplRumC1)	PL 19 (si wplRumC1)	SAM	DTT	Dithionite
Concentration finale	25 μM	100 μM	100 μM	250 μM	10 mM	1 mM

Tableau 7.3 : Conditions expérimentales du test enzymatique de l'enzyme RumMc1 à 25 μM .

7.3.9 Clivage du peptide leader

Le peptide leader de la bactériocine mRumC1 obtenue par expression hétérologue a été clivé par 2 méthodes différentes. Soit par un traitement à la trypsine (TPCK, Sigma-Aldrich®) dans un ratio en masse de 200/1, RumC1/trypsine. Soit par clivage séquentiel RumPc dans un ratio en masse 1/5 RumC1/RumPc puis trypsine dans un ratio en masse de 200/1, RumC1/trypsine. Dans les 2 cas la digestion est réalisée pendant 1 h à 37 °C. Le milieu réactionnel est ensuite purifié par HPLC sur colonne C18 avec un gradient d'acétonitrile. Le peptide purifié est finalement lyophilisé.

7.4 Méthode d'analyse de l'activité antibactérienne

7.4.1 Tests d'activités

Les tests d'activité des bactériocines ont été réalisés contre une souche de *C. perfringens*. Une dilution au millième d'une culture de *C. perfringens* (sur la nuit, en anaérobie), est étalée sur une boîte BHI-YH. Après séchage 30 min à température ambiante, des puits de 6 mm de diamètre sont creusés et 100 μL d'échantillons sont déposés par puit. Une méthode alternative est de déposer directement 10 μL d'échantillon sur le milieu. La présence, ou non, d'halos d'inhibitions autour des échantillons est observée après une incubation à 37 °C pendant 24 h des plaques.

7.4.2 Déterminations des concentrations minimales inhibitrices

Les MIC ont été déterminées sur des souches à Gram positif et à Gram négatif. Toutes les souches ont été cultivées à 37 °C dans du LB (200 rpm), à l'exception des souches *Clostridia* qui ont été cultivées dans du BHI-YH dans des conditions anaérobiques (chambre anaérobie, sans agitation). Le peptide est repris dans de l'eau, stérilisé sous UV pendant 2 min puis ajouté à des plaques de 96 puits dans des concentrations comprises entre 100 et 0,1 μM . Une série de dilution jusqu'au dix-millième est effectuée à partir des souches bactériennes, incluant *C. perfringens*. Concernant les autres *Clostridia* des plus hautes concentrations de bactéries ont été

utilisées, diluées au millième. La MIC est définie comme la concentration la plus faible à laquelle le peptide inhibe la croissance bactérienne après 24 à 48 h d'incubation à 37 °C. Les suspensions bactériennes sont ensuite étalées sur le milieu solide approprié afin d'évaluer la croissance bactérienne. La MBC est alors définie comme la concentration la plus faible à laquelle le peptide est bactéricide après 24 à 48 h d'incubation à 37 °C.

7.5 Méthodes d'analyses

7.5.1 Spectroscopie Mössbauer

La spectroscopie Mössbauer est une technique étudiant l'absorption et l'émission de rayonnements γ , des radiations résultant de transitions nucléaires. Quand un noyau passe d'un état excité (E_E) à son état initial (E_G), un photon γ est émis dont l'énergie est égale à l'énergie de transition moins l'énergie de recul. Cependant dans un état solide, les noyaux étant très serrés, l'énergie du rayon gamma correspond exactement à l'énergie de transition. En conséquence, le photon peut être absorbé par un noyau possédant le même nombre de masse (aussi dans une structure solide), le faisant passer de l'état fondamental à excité. Le ^{57}Fe est l'élément le plus étudié par cette technique. Pour la source de rayon γ , elle est obtenue à partir d'une source radioactive de ^{57}Co , permettant d'exciter le ^{57}Fe pendant quelques microsecondes.

Un spectre Mössbauer montre l'absorption de rayons γ par rapport à la vitesse de la source. L'absorption des rayons γ est caractérisée par deux paramètres résultants des différentes interactions hyperfines causées par les perturbations dues à l'environnement de l'échantillon. Premièrement, le déplacement isomérique δ , en $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, résulte de la différence du noyau absorbant par rapport à celui de la source. Ce paramètre est issu d'une interaction hyperfine entre le noyau et les électrons de l'atome, influençant la densité électronique du noyau et donne des informations sur l'état d'oxydation de l'atome de fer et de son environnement chimique. Deuxièmement, l'éclatement quadrupolaire ΔE_Q , en $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. Autour du noyau la distribution des charges est asymétrique, générant ainsi un gradient de champ électrique. D'un autre côté, quand l'état de spin du noyau $I > 1/2$, il possède un moment quadrupolaire, Q . L'interaction entre ces deux facteurs, conduit à une levée de dégénérescence des niveaux d'énergie du noyau. L'énergie entre deux niveaux correspond à l'éclatement quadrupolaire révélé par un doublet sur le spectre

Mössbauer. Ce paramètre donne des informations sur la symétrie et l'arrangement des charges autour du noyau étudié.

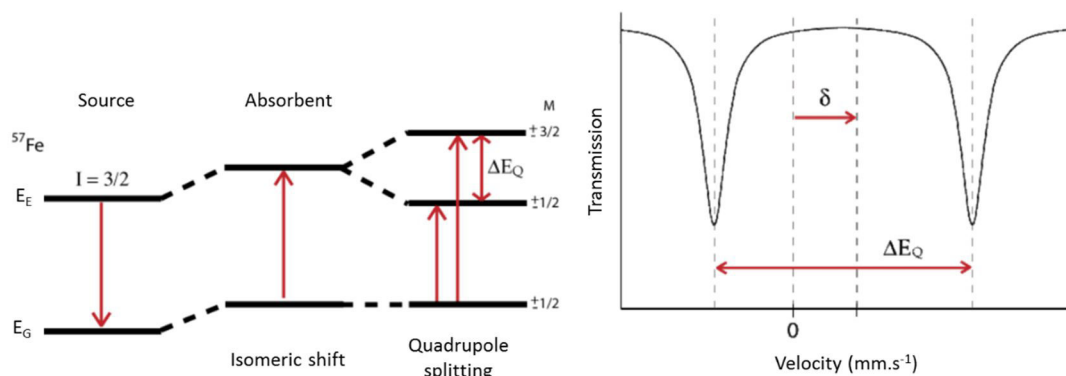


Figure 7.1 : Déplacement isomérique δ et éclatement quadrupolaire ΔE_Q des niveaux d'énergie du noyau et spectre Mössbauer correspondant.

Cette technique a été utilisée afin de caractériser les centres $[4\text{Fe-4S}]$ présents dans l'enzyme de maturation RumMc1. Les échantillons sont préparés dans un volume final de 400 μL pour une concentration de 400 μM , les spectres sont enregistrés à 77 K.

7.5.2 La Résonance Paramagnétique Electronique

La spectroscopie RPE permet l'étude d'espèces paramagnétiques, c'est-à-dire possédant un ou plusieurs électrons célibataires non appariés. L'électron a un mouvement de rotation sur lui-même caractérisé par le nombre quantique de spin \hat{S} . Les valeurs propres ($\pm 1/2$), correspondent aux deux orientations possibles (parallèle et antiparallèle) que peut prendre le spin dans un champ magnétique. Différents niveaux énergétiques vont en résulter entre lesquels des transitions peuvent être induites. Le but de la RPE est d'étudier ces transitions électroniques.

Au sein d'un champ magnétique la dégénérescence de spin intrinsèque d'un électron est levée, c'est ce que l'on appelle l'effet Zeeman. La différence entre les niveaux d'énergies de ce système est $\Delta E = g\beta H$, avec H le champ magnétique (G ou mT), β le magnéton de Bohr ($9,27 \cdot 10^{-24} \text{J.T}^{-1}$), le facteur g permet de rendre compte des déviations de g par rapport à g_e , facteur g de l'électron libre (2,0023). En RPE, les transitions entre les deux niveaux sont induites par une onde électromagnétique, perpendiculaire au champ, de telle sorte que $h\nu = g\beta H$ avec h la constante de Planck ($6,63 \cdot 10^{-34} \text{J.s}^{-1}$) et ν la fréquence en Hertz (Hz). Ces transitions sont traduites en signal d'absorbance dont la dérivée sera enregistrée. Un spectre RPE est caractérisé par sa forme (Lorenzienne ou Gaussienne) sa position (g), son amplitude, et sa largeur (ΔH).

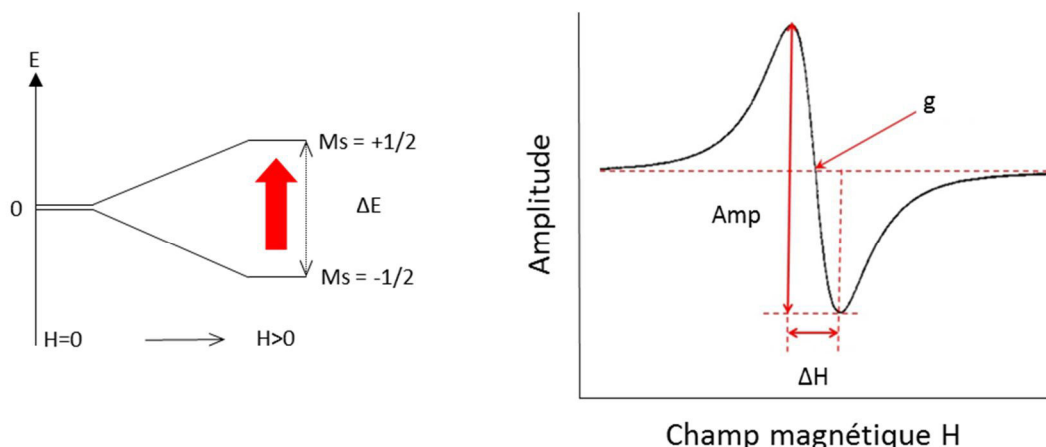


Figure 7.2 : Effet Zeeman et exemple d'un spectre RPE.

La spectroscopie RPE en bande X (fréquence de l'onde électromagnétique à 9388,2 MHz) a été utilisée afin de caractériser les centres [4Fe-4S] présents dans l'enzyme de maturation RumMc1. Les échantillons sont préalablement réduits avec du dithionite (10 mM) puis préparés dans un volume final de 200 μL pour une concentration de 400 μM . Les échantillons ont été analysés sur spectromètre Bruker EMX équipé d'un cryostat (Oxford ESR 9410) permettant de travailler à basse température.

7.5.3 Spectroscopie UV-visible

Cette technique est basée sur l'absorption de photons par un atome ou une molécule. Ce phénomène permet le passage dans un état excité, haut en énergie, par le transfert d'électrons d'une orbitale à l'autre. L'énergie absorbée correspond à la différence en énergie entre l'état excité et l'état initial, $\Delta E = h\nu$, où ν est la fréquence du photon ($\nu = c/\lambda$, λ la longueur d'onde et c la vitesse de la lumière, $3 \cdot 10^8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). En solution les énergies de transitions basses sont observables et chaque absorption est caractérisée par la longueur d'onde où l'absorption atteint son maximum et par son intensité donnée par le coefficient d'extinction molaire (ϵ) à cette longueur d'onde. La loi de Beer-Lambert permet de mettre en relation ces paramètres $A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot l \cdot [C]$ où A_λ est l'absorbance, l la longueur du trajet optique et $[C]$ la concentration de l'échantillon.

La spectroscopie UV-visible a été utilisée pour déterminer les concentrations des différentes préparations protéiques. Les protéines présentant des centres [4Fe-4S] possèdent une bande d'absorption caractéristique vers 420 nm, due au transfert de charges du ligand vers le métal. Pour les études à atmosphère ambiante, les mesures ont été faites sur un spectrophotomètre Cary® 50 UV-Vis (Varian) tandis que les mesures effectuées en anaérobiose ont été faites sur un spectrophotomètre Uvikon XL (BioTek Instruments) couplé par une fibre optique à une cellule à l'intérieur de la boîte à gants.

7.5.4 Chromatographie liquide en phase inverse

La technique HPLC permet de séparer, d'identifier et de quantifier les différents composants d'un mélange. La séparation se fait en accord avec la polarité des molécules. L'échantillon est transporté, par un solvant (phase mobile) à travers une colonne remplie de particules de petites tailles (phases stationnaire). Pour faire circuler la phase mobile à travers la colonne, il est nécessaire d'avoir une pompe à haute pression. Un haut débit permet de réduire le temps de séparation des composants (au contraire de la chromatographie classique) et les particules permettent une meilleure séparation. Ces deux propriétés permettent d'obtenir une haute et rapide résolution, d'où le nom *High Performance*.

Au cours de nos travaux nous avons utilisé l'HPLC en phase inverse. Dans ce cas la phase stationnaire est non polaire. L'équipement utilisé est une HPLC Agilent HP 1100 équipée d'un échantillonneur. Pour l'analyse des tests de maturation de RumC1 par RumMc1 une colonne Zorbax SB-C18, 80 Å, 5 µm, 4,6*250 mm (Agilent) a été utilisée. Elle est composée d'une structure en silice sur laquelle sont greffées des chaînes alkyles de 18 carbones, apolaires. Les composés, du plus polaire au moins polaire, sont élués par un solvant polaire (phase mobile). En changeant la polarité de cette phase par exemple avec un gradient eau/acétonitrile, il est possible de séparer les composants d'un mélange et d'attribuer un temps de rétention unique à chacun.

L'HPLC préparative a aussi été utilisée afin de purifier le peptide RumC1 après la coupure du peptide leader. Pour cela le peptide est injecté sur une colonne Jupiter®, 15 µm, 300 Å, 250 * 21,2 mm (Phenomenex®) et purifié avec le gradient suivant : 10 min à 22 % puis 12 min de 22 % à 38 % d'acétonitrile à 90 % et de TFA à 0,1 %.

7.5.5 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode analytique permettant de déterminer les masses moléculaires de façon précise. Le principe de cette technique est de séparer, au sein d'une phase gazeuse, des molécules ionisées en fonction de leur rapport m/z (masse/charge). On distingue au sein de l'appareillage trois parties importantes : une source d'ions en phase gazeuse, un ou plusieurs analyseurs pour séparer les composés ionisés selon leur m/z et un détecteur transformant le courant ionique en courant électrique exploitable. La spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS) est une technique puissante pour déterminer les propriétés structurales d'une molécule. Cette technique consiste à fragmenter une molécule à l'intérieur du spectromètre comportant plusieurs analyseurs afin de pouvoir avoir accès aux fragments de cette molécule. Le premier analyseur permet de sélectionner les ions avec un certain m/z (extraction d'un ion au sein d'un mélange complexe). Cet ion parent va rentrer dans une chambre de collision où il sera fragmenté pour donner des ions fils (par exemple par collision avec un gaz). Ces ions fragments sont ensuite analysés par un deuxième analyseur (Figure 7.3).

Afin de caractériser les modifications post-traductionnelles de RumC1 les peptides ont été analysés par nano-LC-MS/MS (NCS3500 UHPLC and QExactive HF, Thermo Fisher Scientific). Le couplage avec la chromatographie liquide (LC), permet de simplifier des mélanges complexes avant l'analyse MS pour la rendre optimale. Les peptides sont échantillonnés sur une pré-colonne (300 μ M * 5 mm PepMap C18) et séparés par une nanocolonne (75 μ m * 250 mm C18 column, Reprosil, Cluseau). Un gradient d'acétonitrile de 40 min à 300 nL/min est utilisé pour séparer les peptides et les données MS et MS/MS ont été obtenues en utilisant le logiciel Xcalibur (Thermo Fischer Scientific). Une méthode plus sensible a été utilisée en MS/MS (augmentation du temps de rétention de l'ion piégé de 200 ms) pour augmenter les signaux des fragments du peptide. Pour l'analyse des peptides modifiés, des énergies de dissociations entre 20 et 27 % NCE (*Normalized Collision Energies*) ont été utilisées ; certaines liaisons étant très fragiles ; des fragments étaient déjà observés à partir d'une énergie de 22. Des analyses en mode PRM en utilisant plusieurs énergies ont aussi conduit à améliorer les couvertures de séquençage des molécules d'intérêt.

Dans un premier temps, les données ont été numérisées par le logiciel Mascot Distiller (version 2.5.1, Matrix Science) puis identifiées par Mascot (version 2.6) en se servant des différentes séquences peptidiques comme base de données. Les précisions mentionnées étaient de 10 ppm pour l'ion moléculaire et 20 mmu pour les fragments. Afin d'identifier les peptides, des variables correspondant à des modifications ont été introduites (dehydratation sur les acides aminés A, N, R, K, déamidation sur les acides aminés N et Q, et perte d'ammoniac sur N). Qual Browser and Xtract (Thermo Scientific) ont été utilisés pour l'affichage et la déconvolution des spectres respectivement.

7.5.6 Résonance Magnétique Nucléaire

En RMN, on s'intéresse à l'absorption d'une radiofréquence par un noyau atomique au sein d'un champ magnétique fort. On s'intéresse aux noyaux dont le spin est différent de 0. En solution les moments de spin des différents noyaux sont distribués uniformément et pointent dans n'importe quelle direction. L'application d'un champ magnétique fort aura pour effet, à l'instar de la RPE, d'aligner les noyaux sur le champ magnétique, de façon parallèle et antiparallèle, générant deux états d'énergies différents. En RMN on observe les transitions entre ces deux états, l'énergie de transition qui en résulte dépend donc de la force du champ magnétique. L'environnement local autour du noyau perturbe le champ magnétique et affectera donc l'énergie de transition. De ce fait la RMN est une technique de choix pour l'identification structurale de petites molécules organiques et inorganiques mais peut aussi être utilisée pour la caractérisation de macromolécules.

La RMN des protéines permet d'étudier le repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace. Les spectres RMN sont d'une grande complexité due au nombre important de noyaux présents au sein de l'échantillon. Pour élucider la

structure de RumC1, l'étude du peptide a été faite par RMN hétéronucléaire qui permet d'observer les noyaux carbone et azote en plus des noyaux hydrogène. L'échantillon a été obtenu à partir d'une culture doublement marquée en ^{13}C et ^{15}N , pour une concentration finale de 0,2 mM dans un volume de 200 μL . Des expériences homonucléaires ont été enregistrées avec un échantillon à 2 mM.

Les différents paramètres expérimentaux utilisés pour l'acquisition des spectres RMN pour obtenir l'attribution séquentielle, les déplacements chimiques, les constantes de couplages et les contraintes nOe(s) sont résumés dans le Tableau 7.4.

Expérience	Noyaux	SW (F3)	SW (F2)	SW (F1)	pts (F3)	pts (F2)	pts (F1)	NS
^{15}N -HSQC	^1H , ^{15}N		7200	1920		2048	256	8
^{13}C -HSQC	^1H , ^{13}C		7200	24750		2048	256	16
HNCACB	^1H , ^{15}N , ^{13}C	7200	1920	12000	2048	32	128	64
CBCA(CO)NH	^1H , ^{15}N , ^{13}C	7200	1920	12000	2048	32	128	16
HNCA	^1H , ^{15}N , ^{13}C	7200	1920	6000	2048	32	64	4
HN(CO)CA	^1H , ^{15}N , ^{13}C	7200	1920	6000	2048	32	64	4
HNCO	^1H , ^{15}N , ^{13}C	7200	1920	3000	2048	32	64	4
HN(CA)CO	^1H , ^{15}N , ^{13}C	7200	1920	3000	2048	32	64	8
HNHA	^1H , ^1H , ^{15}N	7200	7200	1920	2048	128	32	8
(H)CCH-TOCSY	^1H , ^{13}C , ^{13}C	7200	12000	12000	2048	64	128	8
^{13}C -TOCSY-HSQC	^1H , ^{13}C , ^1H	7200	12000	7200	2048	64	128	16
^{13}C -NOESY-HSQC	^1H , ^{13}C , ^1H	7200	12000	7200	2048	64	128	16
^{15}N -NOESY-HSQC	^1H , ^{15}N , ^1H	7200	1920	7200	2048	32	128	64
NOESY	^1H , ^1H		8400	8400		2048	512	64
TOCSY	^1H , ^1H		8400	8400		2048	512	64
COSY	^1H , ^1H		8400	8400		2048	512	64

Tableau 7.4 : Paramètres expérimentaux utilisés en RMN. SW : (*spectral width*) largeur spectrale en hertz, pts : (*number of complex points*) nombre de points complexes dans chaque dimension, F3 (pour les 3D) ou F2 (pour les 2D) sont les dimensions de détection directe, NS : (*number of Scans*) nombre d'accumulations. Toutes ces expériences ont été enregistrées à 600 MHz.

7.5.7 Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une spectroscopie d'absorption dans la région UV permettant d'étudier les macromolécules optiquement actives. Les molécules chirales absorbent différemment selon la polarisation de la lumière (dextrogyre ou lévogyre). Cette technique est très utilisée pour l'étude des structures secondaires des protéines.

Le but du dichroïsme circulaire est de mesurer la différence d'absorption d'une protéine quand elle est exposée aux deux polarisations de la lumière. Cela permet d'obtenir des informations sur la structure secondaire de la protéine et aussi d'estimer les proportions de la protéine en hélice α , en feuillet β (β -I ou β -II) ou simplement désordonnée (Figure 7.3).

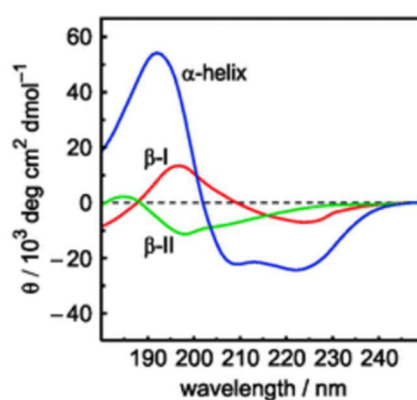


Figure 7.3 : Spectre caractéristique en CD des éléments de structure secondaires (β -I, β -II ou hélice α) (Bulheller et al., 2007).

Le CD est une technique qualitative pour l'étude des changements dans les structures secondaires en fonction de la température ou d'éléments exogènes (protéine, ligands, inhibiteurs...). Elle est non-destructive et nécessite une faible quantité de protéine. Pour ce projet, le CD a été utilisé afin de voir l'évolution de la structure du peptide RumC1 quand il est mûré par RumMc1. Les spectres ont été enregistrés sur un spectrophotomètre J-1500 pour le dichroïsme circulaire (JASCO) en utilisant une cuve en quartz de 350 μ L avec un trajet optique de 1 cm.

Bibliographie

- Agrawal, S., Acharya, D., Adholeya, A., Barrow, C.J., and Deshmukh, S.K. (2017). 'Nonribosomal Peptides from Marine Microbes and Their Antimicrobial and Anticancer Potential', *Frontiers in Pharmacology*, 8. doi: 10.3389/fphar.2017.00828.
- Ali, J., Rafiq, Q.A., and Ratcliffe, E. (2018). 'Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments', *Future Science OA*, 4(4). doi: 10.4155/fsoa-2017-0109.
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., and Handelsman, J. (2010). 'Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments', *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), pp. 251–259. doi: 10.1038/nrmicro2312.
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., and Kuipers, O.P. (2016). 'Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), pp. 2939–2951. doi: 10.1007/s00253-016-7343-9.
- Anoopkumar-Dukie, S., Carey, J.B., Conere, T., O'Sullivan, E., van Pelt, F.N., and Allshire, A. (2005). 'Resazurin assay of radiation response in cultured cells', *The British Journal of Radiology*, 78(934), pp. 945–947. doi: 10.1259/bjr/54004230.
- Antunes, L.C.S., Visca, P., and Towner, K.J. (2014). '*Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen', *Pathogens and Disease*, 71(3), pp. 292–301. doi: 10.1111/2049-632X.12125.
- Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., et al. (2013). 'Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature', *Natural Product Reports*, 30(1), pp. 108–160. doi: 10.1039/c2np20085f.
- Aso, Y., Nagao, J.-I., Koga, H., Okuda, K.-I., Kanemasa, Y., Sashihara, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2004). 'Heterologous expression and functional analysis of the gene cluster for the biosynthesis of and immunity to the lantibiotic, nukacin ISK-1', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(6), pp. 429–436. doi: 10.1016/S1389-1723(05)00308-7.
- Bagley, M.C., Dale, J.W., Merritt, E.A., and Xiong, X. (2005). 'Thiopeptide Antibiotics', *Chemical Reviews*, 105(2), pp. 685–714. doi: 10.1021/cr0300441.
- Barksdale, S.M., Hrifko, E.J., Chung, E.M.-C., and van Hoek, Monique.L. (2016). 'Peptides from American alligator plasma are antimicrobial against multi-drug resistant bacterial pathogens including *Acinetobacter baumannii*', *BMC Microbiology*, 16. doi: 10.1186/s12866-016-0799-z.
- Barlow, M., and Hall, B.G. (2002). 'Phylogenetic Analysis Shows That the OXA b-Lactamase Genes Have Been on Plasmids for Millions of Years', *Journal of Molecular Evolution*, 55(3), pp. 314–321. doi: 10.1007/s00239-002-2328-y.

- Barr, I., Stich, T.A., Gizzi, A.S., Grove, T.L., Bonanno, J.B., Latham, J.A., Chung, T., Wilmot, C.M., Britt, R.D., Almo, S.C., et al. (2018). 'X-ray and EPR Characterization of the Auxiliary Fe-S Clusters in the Radical SAM Enzyme PqqE', *Biochemistry*, 57(8), pp. 1306–1315. doi: 10.1021/acs.biochem.7b01097.
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., and Guery, B. (2018). 'How to manage Pseudomonas aeruginosa infections', *Drugs in Context*, 7. doi: 10.7573/dic.212527.
- Beardmore, R.E., Pena-Miller, R., Gori, F., and Iredell, J. (2017). 'Antibiotic Cycling and Antibiotic Mixing: which one best mitigates antibiotic resistance?', *Molecular Biology and Evolution*, p. msw292. doi: 10.1093/molbev/msw292.
- Begley, M., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2009). 'Identification of a Novel Two-Peptide Lantibiotic, Lichenicidin, following Rational Genome Mining for LanM Proteins', *Applied and Environmental Microbiology*, 75(17), pp. 5451–5460. doi: 10.1128/AEM.00730-09.
- Benjdia, A., Guillot, A., Lefranc, B., Vaudry, H., Leprince, J., and Berteau, O. (2016). 'Thioether bond formation by SPASM domain radical SAM enzymes: C α H-atom abstraction in subtilisin A biosynthesis', *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 52(37), pp. 6249–6252. doi: 10.1039/c6cc01317a.
- Berteau, O., Guillot, A., Benjdia, A., and Rabot, S. (2006). 'A new type of bacterial sulfatase reveals a novel maturation pathway in prokaryotes', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(32), pp. 22464–22470. doi: 10.1074/jbc.M602504200.
- Bhat, U.G., Halasi, M., and Gartel, A.L. (2009). 'FoxM1 is a general target for proteasome inhibitors', *PLoS One*, 4(8), p. e6593. doi: 10.1371/journal.pone.0006593.
- Bindman, N., Merx, R., Koehler, R., Herrman, N., and van der Donk, W.A. (2010). 'Photochemical cleavage of leader peptides', *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 46(47), pp. 8935–8937. doi: 10.1039/c0cc02945a.
- Bindman, N.A., Bobeica, S.C., Liu, W.R., and van der Donk, W.A. (2015). 'Facile Removal of Leader Peptides from Lanthipeptides by Incorporation of a Hydroxy Acid', *Journal of the American Chemical Society*, 137(22), pp. 6975–6978. doi: 10.1021/jacs.5b04681.
- Biswara, L.S., da Costa Sousa, M.G., Rezende, T.M.B., Dias, S.C., and Franco, O.L. (2018). 'Antimicrobial Peptides and Nanotechnology, Recent Advances and Challenges', *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 855. doi: 10.3389/fmicb.2018.00855.
- Bloom, D.E., Black, S., Salisbury, D., and Rappuoli, R. (2018). 'Antimicrobial resistance and the role of vaccines', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(51), pp. 12868–12871. doi: 10.1073/pnas.1717157115.
- Booth, M.C., Bogie, C.P., Sahl, H.G., Siezen, R.J., Hatter, K.L., and Gilmore, M.S. (1996). 'Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic', *Molecular Microbiology*, 21(6), pp. 1175–1184. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.831449.x.
- Broderick, J.B., Duffus, B.R., Duschene, K.S., and Shepard, E.M. (2014). 'Radical S-Adenosylmethionine Enzymes', *Chemical Reviews*, 114(8), pp. 4229–4317. doi: 10.1021/cr4004709.

- Brötz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Götz, F., Bierbaum, G., and Sahl, H.G. (1998). 'Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics', *Molecular Microbiology*, 30(2), pp. 317–327.
- Bruender, N.A., and Bandarian, V. (2016). 'SkfB Abstracts a Hydrogen Atom from C α on SkfA To Initiate Thioether Cross-Link Formation', *Biochemistry*, 55(30), pp. 4131–4134. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00598.
- Bruender, N.A., Wilcoxon, J., Britt, R.D., and Bandarian, V. (2016). 'Biochemical and spectroscopic characterization of a radical SAM enzyme involved in the formation of a peptide thioether crosslink', *Biochemistry*, 55(14), pp. 2122–2134. doi: 10.1021/acs.biochem.6b00145.
- Bulheller, B.M., Rodger, A., and Hirst, J.D. (2007). 'Circular and linear dichroism of proteins', *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9(17), pp. 2020–2035. doi: 10.1039/B615870F.
- Burkhart, B.J., Hudson, G.A., Dunbar, K.L., and Mitchell, D.A. (2015). 'A prevalent peptide-binding domain guides ribosomal natural product biosynthesis', *Nature Chemical Biology*, 11(8), pp. 564–570. doi: 10.1038/nchembio.1856.
- Centers for Disease Control and Prevention (2013). *Antibiotic resistance threats in the United States*.
- Centers for Disease Control and Prevention (2018a). 'How Antibiotic Resistance Happens'. Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/2-2013-508.pdf>.
- Centers for Disease Control and Prevention (2018b). 'Timeline of Antibiotic Resistance Compared to Antibiotic Development'. Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/5-2013-508.pdf>.
- Centers for Disease Control and Prevention (2018c). *Foodborne Illnesses and Germs, Centers for Disease Control and Prevention*. Available at: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html> (Accessed: 4 June 2019).
- Chang, R., Lu, H., Li, M., Zhang, S., Xiong, L., and Sun, Q. (2018). 'Preparation of extra-small nisin nanoparticles for enhanced antibacterial activity after autoclave treatment', *Food Chemistry*, 245, pp. 756–760. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.11.116.
- Chen, S., Xu, B., Chen, E., Wang, J., Lu, J., Donadio, S., Ge, H., and Wang, H. (2019). 'Zn-dependent bifunctional proteases are responsible for leader peptide processing of class III lanthipeptides', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(7), pp. 2533–2538. doi: 10.1073/pnas.1815594116.
- Chiu, L., Bazin, T., Truchetet, M.-E., Schaefferbeke, T., Delhaes, L., and Pradeu, T. (2017). 'Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity', *Frontiers in Immunology*, 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.01678.
- Chiumento, S., Roblin, C., Kieffer-Jaquinod, S., Tachon, S., Leprière, C., Basset, C., Adityarini, D., Olleik, H., Nicoletti, C., Bornet, O., et al. (2019). 'Ruminococcin C, a promising antibiotic produced by a human gut symbiont', *Science Advances*, 5, eaaww9969

Chung, L.K., and Raffatellu, M. (2019). 'G.I. pros: Antimicrobial defense in the gastrointestinal tract', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 88, pp. 129–137. doi: 10.1016/j.semcdb.2018.02.001.

Chung, E.M.C., Dean, S.N., Propst, C.N., Bishop, B.M., and Hoek, M.L. van (2017). 'Komodo dragon-inspired synthetic peptide DRGN-1 promotes wound-healing of a mixed-biofilm infected wound', *npj Biofilms and Microbiomes*, 3(1), p. 9. doi: 10.1038/s41522-017-0017-2.

Cicchillo, R.M., and Booker, S.J. (2005). 'Mechanistic investigations of lipoic acid biosynthesis in *Escherichia coli*: both sulfur atoms in lipoic acid are contributed by the same lipoyl synthase polypeptide', *Journal of the American Chemical Society*, 127(9), pp. 2860–2861. doi: 10.1021/ja042428u.

Cirac, A.D., Moiset, G., Mika, J.T., Koçer, A., Salvador, P., Poolman, B., Marrink, S.J., and Sengupta, D. (2011). 'The Molecular Basis for Antimicrobial Activity of Pore-Forming Cyclic Peptides', *Biophysical Journal*, 100(10), pp. 2422–2431. doi: 10.1016/j.bpj.2011.03.057.

Clark, K.A., Bushin, L.B., and Seyedsayamdost, M.R. (2019). 'Aliphatic Ether Bond Formation Expands the Scope of Radical SAM Enzymes in Natural Product Biosynthesis', *Journal of the American Chemical Society*. doi: 10.1021/jacs.9b05151.

Clatworthy, A.E., Pierson, E., and Hung, D.T. (2007). 'Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy', *Nature Chemical Biology*, 3(9), pp. 541–548. doi: 10.1038/nchembio.2007.24.

Commission Européenne (2005) *Communiqué de presse - Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect*. Available at: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm (Accessed: 22 March 2019).

Crost, E.H., Ajandouz, E.H., Villard, C., Geraert, P.A., Puigserver, A., and Fons, M. (2011). 'Ruminococcin C, a new anti-*Clostridium perfringens* bacteriocin produced in the gut by the commensal bacterium *Ruminococcus gnavus* E1', *Biochimie*, 93(9), pp. 1487–1494. doi: 10.1016/j.biochi.2011.05.001.

Dabard, J., Bridonneau, C., Phillipe, C., Anglade, P., Molle, D., Nardi, M., Ladiré, M., Girardin, H., Marcille, F., Gomez, A., et al. (2001). 'Ruminococcin A, a new lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain isolated from human feces', *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), pp. 4111–4118.

Davies, J. (1994). 'Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes', *Science*, 264(5157), pp. 375–382. doi: 10.1126/science.8153624.

Davies, J. (2013). 'Specialized microbial metabolites: functions and origins', *The Journal of Antibiotics*, 66(7), pp. 361–364. doi: 10.1038/ja.2013.61.

Davies, J., and Davies, D. (2010). 'Origins and Evolution of Antibiotic Resistance', *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74(3), pp. 417–433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.

- Davis, K.M., Schramma, K.R., Hansen, W.A., Bacik, J.P., Khare, S.D., Seyedsayamdost, M.R., and Ando, N. (2017). 'Structures of the peptide-modifying radical SAM enzyme SuiB elucidate the basis of substrate recognition', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(39), pp. 10420–10425. doi: 10.1073/pnas.1703663114.
- D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., et al. (2011). 'Antibiotic resistance is ancient', *Nature*, 477(7365), pp. 457–461. doi: 10.1038/nature10388.
- Delattin, N., Brucker, K.D., Cremer, K.D., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2017). 'Antimicrobial Peptides as a Strategy to Combat Fungal Biofilms', *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(5), pp. 604–612.
- Demick, J.M., and Lanzilotta, W.N. (2011). 'Radical SAM activation of the B12-independent glycerol dehydratase results in formation of 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine and not 5'-deoxyadenosine', *Biochemistry*, 50(4), pp. 440–442. doi: 10.1021/bi101255e.
- Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L.V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M., and Figura, K. von (2003). 'Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C α -Formylglycine generating enzyme', *Cell*, 113, pp. 435–444.
- Dingsdag, S.A., and Hunter, N. (2018). 'Metronidazole: an update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), pp. 265–279. doi: 10.1093/jac/dkx351.
- Direction générale de la mondialisation, du développement et des partenariats (2011). *Position française sur le concept « One Health/Une seule santé »*.
- Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Hernández-Allés, S., del Carmen Conejo, M., Pascual, Á., Tomás, J.M., Albertí, S., and Benedí, V.J. (2003). 'Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), pp. 3332–3335. doi: 10.1128/AAC.47.10.3332-3335.2003.
- Donia, M., and Schmidt, E. (2010). 'Cyanobactins - Ubiquitous Cyanobacterial Ribosomal Peptide Metabolites', in *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*. Elsevier. Moore BS, Crews P, p. 539.
- Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., and Berekzi, N. (2017). 'A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms', *Viruses*, 9(3), p. 50. doi: 10.3390/v9030050.
- Dowling, D.P., Bruender, N.A., Young, A.P., McCarty, R.M., Bandarian, V., and Drennan, C.L. (2014). 'Radical SAM enzyme QueE defines a new minimal core fold and metal-dependent mechanism', *Nature Chemical Biology*, 10(2), pp. 106–112. doi: 10.1038/nchembio.1426.
- Dubey, G.P., and Ben-Yehuda, S. (2011). 'Intercellular Nanotubes Mediate Bacterial Communication', *Cell*, 144(4), pp. 590–600. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.015.

Ducruet, C. (2018). *Sanofi et Evotec font R & D commune dans les maladies infectieuses*, *lesechos.fr*. Available at: https://www.lesechos.fr/08/03/2018/lesechos.fr/0301392092262_sanofi-et-evotec-font-r--d-commune-dans-les-maladies-infectieuses.htm (Accessed: 21 March 2019).

Duquesne, S., Destoumieux-Garzón, D., Zirah, S., Goulard, C., Peduzzi, J., and Rebuffat, S. (2007). 'Two enzymes catalyze the maturation of a lasso peptide in *Escherichia coli*', *Chemistry & Biology*, 14(7), pp. 793–803. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.06.004.

Field, D., Blake, T., Mathur, H., O' Connor, P.M., Cotter, P.D., Paul Ross, R., and Hill, C. (2019). 'Bioengineering nisin to overcome the nisin resistance protein', *Molecular Microbiology*, 111(3), pp. 717–731. doi: 10.1111/mmi.14183.

Fish, W.W. (1988). 'Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples', *Methods in Enzymology*, 158, pp. 357–364.

Flühe, L., and Marahiel, M.A. (2013). 'Radical S-adenosylmethionine enzyme catalyzed thioether bond formation in sactipeptide biosynthesis', *Current Opinion in Chemical Biology*. (Mechanisms • Molecular imaging), 17(4), pp. 605–612. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.06.031.

Flühe, L., Knappe, T.A., Gattner, M.J., Schäfer, A., Burghaus, O., Linne, U., and Marahiel, M.A. (2012). 'The radical SAM enzyme AlbA catalyzes thioether bond formation in subtilisin A', *Nature Chemical Biology*, 8(4), pp. 350–357. doi: 10.1038/nchembio.798.

Fontecave, M., Atta, M., and Mulliez, E. (2004). 'S-adenosylmethionine: nothing goes to waste', *Trends in Biochemical Sciences*, 29(5), pp. 243–249. doi: 10.1016/j.tibs.2004.03.007.

Forouhar, F., Arragain, S., Atta, M., Gambarelli, S., Mouesca, J.-M., Hussain, M., Xiao, R., Kieffer-Jaquinod, S., Seetharaman, J., Acton, T.B., et al. (2013). 'Two Fe-S clusters catalyze sulfur insertion by Radical-SAM methylthiotransferases', *Nature chemical biology*, 9(5), pp. 333–338. doi: 10.1038/nchembio.1229.

Furfaro, L.L., Payne, M.S., and Chang, B.J. (2018). 'Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fcimb.2018.00376.

Furuya, E.Y., and Lowy, F.D. (2006). 'Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting', *Nature Reviews Microbiology*, 4(1), pp. 36–45. doi: 10.1038/nrmicro1325.

Garcia-Gutierrez, E., Mayer, M.J., Cotter, P.D., and Narbad, A. (2019). 'Gut microbiota as a source of novel antimicrobials', *Gut Microbes*, 10(1), pp. 1–21. doi: 10.1080/19490976.2018.1455790.

Gibbs, E.P. (2014). 'The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future', *The Veterinary Record*, (174(4)), pp. 85–91.

Goldman, P.J., Grove, T.L., Sites, L.A., McLaughlin, M.I., Booker, S.J., and Drennan, C.L. (2013a). 'X-ray structure of an AdoMet radical activase reveals an anaerobic solution for formylglycine posttranslational modification', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(21), pp. 8519–8524. doi: 10.1073/pnas.1302417110.

- Goldman, P.J., Grove, T.L., Booker, S.J., and Drennan, C.L. (2013b). 'X-ray analysis of butirosin biosynthetic enzyme BtrN redefines structural motifs for AdoMet radical chemistry', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), pp. 15949–15954. doi: 10.1073/pnas.1312228110.
- Gomez, A., Ladiré, M., Marcille, F., and Fons, M. (2002). 'Trypsin Mediates Growth Phase-Dependent Transcriptional Regulation of Genes Involved in Biosynthesis of Ruminococcin A, a Lantibiotic Produced by a *Ruminococcus gnavus* Strain from a Human Intestinal Microbiota', *Journal of Bacteriology*, 184(1), pp. 18–28. doi: 10.1128/JB.184.1.18-28.2002.
- Gordon, Y.J., Romanowski, E.G., and McDermott, A.M. (2005). 'A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs', *Current Eye Research*, 30(7), pp. 505–515. doi: 10.1080/02713680590968637.
- Goto, Y., Ito, Y., Kato, Y., Tsunoda, S., and Suga, H. (2014). 'One-Pot Synthesis of Azoline-Containing Peptides in a Cell-free Translation System Integrated with a Posttranslational Cyclodehydratase', *Chemistry & Biology*, 21(6), pp. 766–774. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.04.008.
- Grell, T.A.J., Goldman, P.J., and Drennan, C.L. (2015). 'SPASM and twitch domains in S-adenosylmethionine (SAM) radical enzymes', *The Journal of Biological Chemistry*, 290(7), pp. 3964–3971. doi: 10.1074/jbc.R114.581249.
- Grell, T.A.J., Kincannon, W.M., Bruender, N.A., Blaes, E.J., Krebs, C., Bandarian, V., and Drennan, C.L. (2018). 'Structural and spectroscopic analyses of the sporulation killing factor biosynthetic enzyme SkfB, a bacterial AdoMet radical sactisynthase', *The Journal of Biological Chemistry*, 293(45), pp. 17349–17361. doi: 10.1074/jbc.RA118.005369.
- Gressent, F., Da Silva, P., Eyraud, V., Karaki, L., and Royer, C. (2011). 'Pea Albumin 1 subunit b (PA1b), a promising bioinsecticide of plant origin', *Toxins*, 3(12), pp. 1502–1517. doi: 10.3390/toxins3121502.
- Griffin, J.E., Gawronski, J.D., Dejesus, M.A., Ioerger, T.R., Akerley, B.J., and Sasseti, C.M. (2011). 'High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism', *PLoS pathogens*, 7(9), p. e1002251. doi: 10.1371/journal.ppat.1002251.
- Grove, T.L., Himes, P.M., Hwang, S., Yumerefendi, H., Bonanno, J.B., Kuhlman, B., Almo, S.C., and Bowers, A.A. (2017). 'Structural Insights into Thioether Bond Formation in the Biosynthesis of Sactipeptides', *Journal of the American Chemical Society*, 139(34), pp. 11734–11744. doi: 10.1021/jacs.7b01283.
- Haft, D.H. (2011). 'Bioinformatic evidence for a widely distributed, ribosomally produced electron carrier precursor, its maturation proteins, and its nicotinoprotein redox partners', *BMC Genomics*, 12, p. 21. doi: 10.1186/1471-2164-12-21.
- Haft, D.H., and Basu, M.K. (2011). 'Biological systems discovery in silico: radical S-adenosylmethionine protein families and their target peptides for posttranslational modification', *Journal of Bacteriology*, 193(11), pp. 2745–2755. doi: 10.1128/JB.00040-11.

- Hänzelmann, P., and Schindelin, H. (2004). 'Crystal structure of the S-adenosylmethionine-dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(35), pp. 12870–12875. doi: 10.1073/pnas.0404624101.
- Hänzelmann, P., and Schindelin, H. (2006). 'Binding of 5'-GTP to the C-terminal FeS cluster of the radical S-adenosylmethionine enzyme MoaA provides insights into its mechanism', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(18), pp. 6829–6834. doi: 10.1073/pnas.0510711103.
- Hegemann, J.D., and van der Donk, W.A. (2018). 'Investigation of Substrate Recognition and Biosynthesis in Class IV Lanthipeptide Systems', *Journal of the American Chemical Society*, 140(17), pp. 5743–5754. doi: 10.1021/jacs.8b01323.
- Hegemann, J.D., Zimmermann, M., Xie, X., and Marahiel, M.A. (2015). 'Lasso Peptides: An Intriguing Class of Bacterial Natural Products', *Accounts of Chemical Research*, 48(7), pp. 1909–1919. doi: 10.1021/acs.accounts.5b00156.
- Henninot, A., Collins, J.C., and Nuss, J.M. (2018). 'The Current State of Peptide Drug Discovery: Back to the Future?', *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(4), pp. 1382–1414. doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00318
- Himes, P.M., Allen, S.E., Hwang, S., and Bowers, A.A. (2016). 'Production of Sactipeptides in *Escherichia coli*: Probing the Substrate Promiscuity of Subtilosin A Biosynthesis', *ACS Chemical Biology*, 11(6), pp. 1737–1744. doi: 10.1021/acscchembio.6b00042.
- Holmes, A.H., Moore, L.S.P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J., and Piddock, L.J.V. (2016). 'Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance', *The Lancet*, 387(10014), pp. 176–187. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00473-0.
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S., and Nes, I.F. (2001). 'Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics', *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 3), pp. 643–651. doi: 10.1099/00221287-147-3-643.
- Houssen, W.E., and Jaspars, M. (2010). 'Azole-Based Cyclic Peptides from the Sea Squirt *Lissoclinum patella*: Old Scaffolds, New Avenues', *ChemBioChem*, 11(13), pp. 1803–1815. doi: 10.1002/cbic.201000230.
- Huang, T., Geng, H., Miyapuram, V.R., Sit, C.S., Vederas, J.C., and Nakano, M.M. (2009). 'Isolation of a variant of subtilosin A with hemolytic activity', *Journal of Bacteriology*, 191(18), pp. 5690–5696. doi: 10.1128/JB.00541-09.
- Hudson, G.A., and Mitchell, D.A. (2018). 'RiPP antibiotics: biosynthesis and engineering potential', *Current Opinion in Microbiology*, 45, pp. 61–69. doi: 10.1016/j.mib.2018.02.010.
- Hudson, G.A., Burkhart, B.J., DiCaprio, A.J., Schwalen, C.J., Kille, B., Pogorelov, T.V., and Mitchell, D.A. (2019). 'Bioinformatic Mapping of Radical S-Adenosylmethionine-Dependent Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptides Identifies New C α , C β , and C γ -Linked Thioether-Containing Peptides', *Journal of the American Chemical Society*, 141(20), pp. 8228–8238. doi: 10.1021/jacs.9b01519.

- Jansen, K.U., Knirsch, C., and Anderson, A.S. (2018). 'The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance', *Nature Medicine*, 24(1), pp. 10–19. doi: 10.1038/nm.4465.
- Jin, L., Wu, X., Xue, Y., Jin, Y., Wang, S., and Chen, Y. (2017). 'Mutagenesis of NosM Leader Peptide Reveals Important Elements in Nosiheptide Biosynthesis', *Applied and Environmental Microbiology*, 83(4). doi: 10.1128/AEM.02880-16.
- Jones, A.M., and Helm, J.M. (2009). 'Emerging treatments in cystic fibrosis', *Drugs*, 69(14), pp. 1903–1910. doi: 10.2165/11318500-000000000-00000.
- Jones, D.E., Salin, D.V., and Williams, D.G.W. (2005). 'NISIN AND THE MARKET FOR COMMERCIAL BACTERIOCINS', p. 25.
- Kapoor, G., Saigal, S., and Elongavan, A. (2017). 'Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians', *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 33(3), pp. 300–305. doi: 10.4103/joacp.JOACP_349_15.
- Karpiński, T.M., and Adamczak, A. (2018). 'Anticancer Activity of Bacterial Proteins and Peptides', *Pharmaceutics*, 10(2). doi: 10.3390/pharmaceutics10020054.
- Kaur, S., and Kaur, S. (2015). 'Bacteriocins as Potential Anticancer Agents', *Frontiers in Pharmacology*, 6. doi: 10.3389/fphar.2015.00272.
- Kawulka, K., Sprules, T., McKay, R.T., Mercier, P., Diaper, C.M., Zuber, P., and Vederas, J.C. (2003). 'Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to alpha-carbons of phenylalanine and threonine', *Journal of the American Chemical Society*, 125(16), pp. 4726–4727. doi: 10.1021/ja029654t.
- Kawulka, K.E., Sprules, T., Diaper, C.M., Whittal, R.M., McKay, R.T., Mercier, P., Zuber, P., and Vederas, J.C. (2004). 'Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to alpha-carbon cross-links: formation and reduction of alpha-thio-alpha-amino acid derivatives', *Biochemistry*, 43(12), pp. 3385–3395. doi: 10.1021/bi0359527..
- Khaliullin, B., Aggarwal, P., Bubas, M., Eaton, G.R., Eaton, S.S., and Latham, J.A. (2016). 'Mycofactocin biosynthesis: modification of the peptide MftA by the radical S-adenosylmethionine protein MftC', *FEBS letters*, 590(16), pp. 2538–2548. doi: 10.1002/1873-3468.12249.
- Kincannon, W.M., Bruender, N.A., and Bandarian, V. (2018). 'A Radical Clock Probe Uncouples H Atom Abstraction from Thioether Cross-Link Formation by the Radical S-Adenosyl-L-methionine Enzyme SkfB', *Biochemistry*, 57(32), pp. 4816–4823. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00537.
- Kingwell, K. (2018). 'Vaccines take a shot at antimicrobial resistance', *Nature Reviews Drug Discovery*, 17, pp. 229–231. doi: 10.1038/nrd.2018.8.

Koehnke, J., Mann, G., Bent, A.F., Ludewig, H., Shirran, S., Botting, C., Lebl, T., Houssen, W., Jaspars, M., and Naismith, J.H. (2015). 'Structural analysis of leader peptide binding enables leader-free cyanobactin processing', *Nature Chemical Biology*, 11(8), pp. 558–563. doi: 10.1038/nchembio.1841.

Kuthning, A., Mösker, E., and Süssmuth, R.D. (2015). 'Engineering the heterologous expression of lanthipeptides in *Escherichia coli* by multigene assembly', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(15), pp. 6351–6361. doi: 10.1007/s00253-015-6557-6.

Layer, G., Grage, K., Teschner, T., Schünemann, V., Breckau, D., Masoumi, A., Jahn, M., Heathcote, P., Trautwein, A.X., and Jahn, D. (2005). 'Radical S-Adenosylmethionine Enzyme Coproporphyrinogen III Oxidase HemN FUNCTIONAL FEATURES OF THE [4Fe-4S] CLUSTER AND THE TWO BOUND S-ADENOSYL-L-METHIONINES', *Journal of Biological Chemistry*, 280(32), pp. 29038–29046. doi: 10.1074/jbc.M501275200.

Lee, H., Churey, J.J., and Worobo, R.W. (2009). 'Biosynthesis and transcriptional analysis of thurincin H, a tandem repeated bacteriocin genetic locus, produced by *Bacillus thuringiensis* SF361', *FEMS Microbiology Letters*, 299(2), pp. 205–213. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01749.x.

Lees, N.S., Hänzelmann, P., Hernandez, H.L., Subramanian, S., Schindelin, H., Johnson, M.K., and Hoffman, B.M. (2009). 'ENDOR Spectroscopy Shows That Guanine N1 Binds to [4Fe-4S] Cluster II of the S-Adenosylmethionine-Dependent Enzyme MoeA: Mechanistic Implications', *Journal of the American Chemical Society*, 131(26), pp. 9184–9185. doi: 10.1021/ja903978u.

Lin, D.M., Koskella, B., and Lin, H.C. (2017a). 'Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance', *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 8(3), p. 162. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162.

Lin, P.F., Samanta, H., Bechtold, C.M., Deminie, C.A., Patick, A.K., Alam, M., Riccardi, K., Rose, R.E., White, R.J., and Colonno, R.J. (1996). 'Characterization of siamycin I, a human immunodeficiency virus fusion inhibitor.', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(1), pp. 133–138.

Lin, Z., He, Q., and Liu, W. (2017b). 'Bio-inspired engineering of thiopeptide antibiotics advances the expansion of molecular diversity and utility', *Current Opinion in Biotechnology*, 48, pp. 210–219. doi: 10.1016/j.copbio.2017.06.008.

Linares-Otoya, L., Linares-Otoya, V., Armas-Mantilla, L., Blanco-Olano, C., Crüsemann, M., Ganoza-Yupanqui, M.L., Campos-Florian, J., König, G.M., and Schäberle, T.F. (2017). 'Identification and heterologous expression of the kocurin biosynthetic gene cluster', *Microbiology (Reading, England)*. doi: 10.1099/mic.0.000538.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (2001). 'Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1–3), pp. 3–26.

- Liu, W.-T., Yang, Y.-L., Xu, Y., Lamsa, A., Haste, N.M., Yang, J.Y., Ng, J., Gonzalez, D., Ellermeier, C.D., Straight, P.D., et al. (2010). 'Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), pp. 16286–16290. doi: 10.1073/pnas.1008368107.
- Logan, L.K. (2012). 'Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: An Emerging Problem in Children', *Clinical Infectious Diseases*, 55(6), pp. 852–859. doi: 10.1093/cid/cis543.
- Lohans, C.T., and Vederas, J.C. (2014). 'Structural characterization of thioether-bridged bacteriocins', *The Journal of Antibiotics*, 67(1), pp. 23–30. doi: 10.1038/ja.2013.81.
- Lohans, C.T., Li, J.L., and Vederas, J.C. (2014). 'Structure and Biosynthesis of Carnolysin, a Homologue of Enterococcal Cytolysin with d-Amino Acids', *Journal of the American Chemical Society*, 136(38), pp. 13150–13153. doi: 10.1021/ja5070813.
- Mahanta, N., Hudson, G.A., and Mitchell, D.A. (2017). 'Radical S-Adenosylmethionine Enzymes Involved in RiPP Biosynthesis', *Biochemistry*, 56(40), pp. 5229–5244. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00771.
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., and Björn, C. (2016). 'Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. doi: 10.3389/fcimb.2016.00194.
- Marcille, F., Gomez, A., Joubert, P., Ladiré, M., Veau, G., Clara, A., Gavini, F., Willems, A., and Fons, M. (2002). 'Distribution of Genes Encoding the Trypsin-Dependent Lantibiotic Ruminococcin A among Bacteria Isolated from Human Fecal Microbiota', *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(7), pp. 3424–3431. doi: 10.1128/AEM.68.7.3424-3431.2002.
- Martinez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., and Alvarez-Ortega, C. (2009). 'Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems', *FEMS microbiology reviews*, 33(2), pp. 430–449. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00157.x.
- Martinez Jose L. (2009). 'The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1667), pp. 2521–2530. doi: 10.1098/rspb.2009.0320.
- Marx, V. (2005). 'WATCHING PEPTIDE DRUGS GROW UP', *Chem. Eng. News*, 83(11), pp. 17–24.
- Mathur, H., O'Connor, P.M., Hill, C., Cotter, P.D., and Ross, R.P. (2013). 'Analysis of Anti-*Clostridium difficile* Activity of Thuricin CD, Vancomycin, Metronidazole, Ramoplanin, and Actagardine, both Singly and in Paired Combinations', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(6), pp. 2882–2886. doi: 10.1128/AAC.00261-13.
- Mathur, H., Rea, M.C., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2016). 'The efficacy of thuricin CD, tigecycline, vancomycin, teicoplanin, rifampicin and nitazoxanide, independently and in paired combinations against *Clostridium difficile* biofilms and planktonic cells', *Gut Pathogens*, 8. doi: 10.1186/s13099-016-0102-8.

Mathur, H., Fallico, V., O'Connor, P.M., Rea, M.C., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2017). 'Insights into the Mode of Action of the Sactibiotic Thuricin CD', *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.00696.

McClerren, A.L., Cooper, L.E., Quan, C., Thomas, P.M., Kelleher, N.L., and van der Donk, W.A. (2006). 'Discovery and in vitro biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), pp. 17243–17248. doi: 10.1073/pnas.0606088103.

McConkey, G.A., Rogers, M.J., and McCutchan, T.F. (1997). 'Inhibition of *Plasmodium falciparum* protein synthesis. Targeting the plastid-like organelle with thiostrepton', *The Journal of Biological Chemistry*, 272(4), pp. 2046–2049. doi: 10.1074/jbc.272.4.2046.

McGlynn, S.E., Boyd, E.S., Shepard, E.M., Lange, R.K., Gerlach, R., Broderick, J.B., and Peters, J.W. (2010). 'Identification and Characterization of a Novel Member of the Radical AdoMet Enzyme Superfamily and Implications for the Biosynthesis of the Hmd Hydrogenase Active Site Cofactor', *Journal of Bacteriology*, 192(2), pp. 595–598. doi: 10.1128/JB.01125-09.

Meindl, K., Schmiederer, T., Schneider, K., Reicke, A., Butz, D., Keller, S., Gühring, H., Vértesy, L., Wink, J., Hoffmann, H., et al. (2010). 'Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics', *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 49(6), pp. 1151–1154. doi: 10.1002/anie.200905773.

Mevaere, J., Goulard, C., Schneider, O., Sekurova, O.N., Ma, H., Zirah, S., Afonso, C., Rebuffat, S., Zotchev, S.B., and Li, Y. (2018). 'An orthogonal system for heterologous expression of actinobacterial lasso peptides in *Streptomyces* hosts', *Scientific Reports*, 8(1), p. 8232. doi: 10.1038/s41598-018-26620-0.

Munita, J.M., and Arias, C.A. (2016). 'Mechanisms of Antibiotic Resistance', *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*, pp. 481–511. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

Navarathna, D.H.M.L.P., Hornby, J.M., Krishnan, N., Parkhurst, A., Duhamel, G.E., and Nickerson, K.W. (2007). 'Effect of Farnesol on a Mouse Model of Systemic Candidiasis, Determined by Use of a DPP3 Knockout Mutant of *Candida albicans*', *Infection and Immunity*, 75(4), pp. 1609–1618. doi: 10.1128/IAI.01182-06.

Neeno-Eckwall, E.C., Kinkel, L.L., and Schottel, J.L. (2001). 'Competition and antibiosis in the biological control of potato scab', *Canadian Journal of Microbiology*, 47(4), pp. 332–340.

Nonejuie, P., Burkart, M., Pogliano, K., and Pogliano, J. (2013). 'Bacterial cytological profiling rapidly identifies the cellular pathways targeted by antibacterial molecules', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), pp. 16169–16174. doi: 10.1073/pnas.1311066110.

Oman, T.J., and van der Donk, W.A. (2010). 'Follow the leader: The use of leader peptides to guide natural product biosynthesis', *Nature chemical biology*, 6(1), pp. 9–18. doi: 10.1038/nchembio.286.

O'Neill, J. (2016). 'TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS', *Review on Antimicrobial Resistance*.

- Ongey, E.L., Giessmann, R.T., Fons, M., Rappsilber, J., Adrian, L., and Neubauer, P. (2018). 'Heterologous Biosynthesis, Modifications and Structural Characterization of Ruminococcin-A, a Lanthipeptide From the Gut Bacterium *Ruminococcus gnavus* E1, in *Escherichia coli*', *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01688.
- Ortega, M.A., and van der Donk, W.A. (2016). 'New Insights into the Biosynthetic Logic of Ribosomally Synthesized and Post-Translationally Modified Peptide Natural Products', *Cell chemical biology*, 23(1), pp. 31–44. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.11.012.
- Pujol, A., Crost, E.H., Simon, G., Barbe, V., Vallenet, D., Gomez, A., and Fons, M. (2011). 'Characterization and distribution of the gene cluster encoding RumC, an anti-*Clostridium perfringens* bacteriocin produced in the gut', *FEMS microbiology ecology*, 78(2), pp. 405–415. doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01176.x.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., et al. (2010). 'A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing', *Nature*, 464(7285), pp. 59–65. doi: 10.1038/nature08821.
- Ramare, F., Nicoli, J., Dabard, J., Corring, T., Ladire, M., Gueugneau, A.M., and Raibaud, P. (1993). 'Trypsin-dependent production of an antibacterial substance by a human *Peptostreptococcus* strain in gnotobiotic rats and in vitro', *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9), pp. 2876–2883.
- Rea, M.C., Sit, C.S., Clayton, E., O'Connor, P.M., Whittall, R.M., Zheng, J., Vederas, J.C., Ross, R.P., and Hill, C. (2010). 'Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20), pp. 9352–9357. doi: 10.1073/pnas.0913554107.
- Recksiek, M., Selmer, T., Dierks, T., Schmidt, B., and Figura, K. von (1998). 'Sulfatases, Trapping of the Sulfated Enzyme Intermediate by Substituting the Active Site Formylglycine', *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), pp. 6096–6103. doi: 10.1074/jbc.273.11.6096.
- Saha, D., and Mukherjee, R. (2019). 'Ameliorating the antimicrobial resistance crisis: phage therapy: AMELIORATING THE ANTIMICROBIAL RESISTANCE CRISIS', *IUBMB Life*. doi: 10.1002/iub.2010.
- Schoof, S., Pradel, G., Aminake, M.N., Ellinger, B., Baumann, S., Potowski, M., Najajreh, Y., Kirschner, M., and Arndt, H.-D. (2010). 'Antiplasmodial thioStrepton derivatives: proteasome inhibitors with a dual mode of action', *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 49(19), pp. 3317–3321. doi: 10.1002/anie.200906988.
- Shelburne, C.E., An, F.Y., Dholpe, V., Ramamoorthy, A., Lopatin, D.E., and Lantz, M.S. (2007). 'The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A', *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), pp. 297–300. doi: 10.1093/jac/dkl495.
- Si, T., Tian, Q., Min, Y., Zhang, L., Sweedler, J.V., van der Donk, W.A., and Zhao, H. (2018). 'Rapid Screening of Lanthipeptide Analogs via In-Colony Removal of Leader Peptides in *Escherichia coli*', *Journal of the American Chemical Society*, 140(38), pp. 11884–11888. doi: 10.1021/jacs.8b05544.

- Silkin, L., Hamza, S., Kaufman, S., Cobb, S.L., and Vederas, J.C. (2008). 'Spermicidal bacteriocins: lacticin 3147 and subtilosin A', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(10), pp. 3103–3106. doi: 10.1016/j.bmcl.2007.11.024.
- Sit, C.S., van Belkum, M.J., McKay, R.T., Worobo, R.W., and Vederas, J.C. (2011a). 'The 3D solution structure of thurincin H, a bacteriocin with four sulfur to α -carbon crosslinks', *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 50(37), pp. 8718–8721. doi: 10.1002/anie.201102527.
- Sit, C.S., McKay, R.T., Hill, C., Ross, R.P., and Vederas, J.C. (2011b). 'The 3D Structure of Thuricin CD, a Two-Component Bacteriocin with Cysteine Sulfur to α -Carbon Cross-links', *Journal of the American Chemical Society*, 133(20), pp. 7680–7683. doi: 10.1021/ja201802f.
- Sivieri, K., Bassan, J., Peixoto, G., and Monti, R. (2017). 'Gut microbiota and antimicrobial peptides', *Current Opinion in Food Science*. (Food chemistry and biochemistry • Food bioprocessing), 13, pp. 56–62. doi: 10.1016/j.cofs.2017.02.010.
- Stewart, P.S., and William Costerton, J. (2001). 'Antibiotic resistance of bacteria in biofilms', *The Lancet*, 358(9276), pp. 135–138. doi: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1.
- Sun, Z., Zhong, J., Liang, X., Liu, J., Chen, X., and Huan, L. (2009). 'Novel Mechanism for Nisin Resistance via Proteolytic Degradation of Nisin by the Nisin Resistance Protein NSR', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), pp. 1964–1973. doi: 10.1128/AAC.01382-08.
- Sweere, J.M., Belleghem, J.D.V., Ishak, H., Bach, M.S., Popescu, M., Sunkari, V., Kaber, G., Manasherob, R., Suh, G.A., Cao, X., et al. (2019). 'Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection', *Science*, 363(6434), p. eaat9691. doi: 10.1126/science.aat9691.
- The Regional Office for Europe of the World Health Organization (2016). 'Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance - Annual report 2016', *Annual report*, p. 152.
- The Regional Office for Europe of the World Health Organization (2017). 'Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance - Annual report 2017', *Annual report*, p. 143.
- Thennarasu, S., Lee, D.-K., Poon, A., Kawulka, K.E., Vederas, J.C., and Ramamoorthy, A. (2005). 'Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilosin A', *Chemistry and Physics of Lipids*, 137(1–2), pp. 38–51. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2005.06.003.
- Thibodeaux, G.N., McClerren, A.L., Ma, Y., Gancayco, M.R., and van der Donk, W.A. (2015). 'Synergistic binding of the leader and core peptides by the lantibiotic synthetase HalM2', *ACS chemical biology*, 10(4), pp. 970–977. doi: 10.1021/cb5009876.
- Ugulava, N.B., Sacanell, C.J., and Jarrett, J.T. (2001). 'Spectroscopic changes during a single turnover of biotin synthase: destruction of a [2Fe-2S] cluster accompanies sulfur insertion', *Biochemistry*, 40(28), pp. 8352–8358. doi: 10.1021/bi010463x.

- Velterop, J.S., Sellink, E., Meulenbergh, J.J., David, S., Bulder, I., and Postma, P.W. (1995). 'Synthesis of pyrroloquinoline quinone in vivo and in vitro and detection of an intermediate in the biosynthetic pathway', *Journal of Bacteriology*, 177(17), pp. 5088–5098. doi: 10.1128/jb.177.17.5088-5098.1995.
- Vey, J.L., and Drennan, C.L. (2011). 'Structural insights into radical generation by the radical SAM superfamily', *Chemical Reviews*, 111(4), pp. 2487–2506. doi: 10.1021/cr9002616.
- Völler, G.H., Krawczyk, B., Ensle, P., and Süssmuth, R.D. (2013). 'Involvement and unusual substrate specificity of a prolyl oligopeptidase in class III lanthipeptide maturation', *Journal of the American Chemical Society*, 135(20), pp. 7426–7429. doi: 10.1021/ja402296m.
- W Schmidt, E., T Nelson, J., A Rasko, D., Sudek, S., Eisen, J., Haygood, M., and Ravel, J. (2005). 'Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, pp. 7315–20. doi: 10.1073/pnas.0501424102.
- Walker, L.M., Kincannon, W.M., Bandarian, V., and Elliott, S.J. (2018). 'Deconvoluting the Reduction Potentials for the Three [4Fe-4S] Clusters in an AdoMet Radical SCIFF Maturase', *Biochemistry*, 57(42), pp. 6050–6053. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00846.
- Wang, G., Manns, D.C., Churey, J.J., and Worobo, R.W. (2014a). 'Development of a homologous expression system for and systematic site-directed mutagenesis analysis of thurincin H, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* SF361', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(12), pp. 3576–3584. doi: 10.1128/AEM.00433-14.
- Wang, G., Manns, D.C., Guron, G.K., Churey, J.J., and Worobo, R.W. (2014b). 'Large-Scale Purification, Characterization, and Spore Outgrowth Inhibitory Effect of Thurincin H, a Bacteriocin Produced by *Bacillus thuringiensis* SF361', *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(2), pp. 105–113. doi: 10.1007/s12602-014-9159-1.
- Wang, G., Feng, G., Snyder, A.B., Manns, D.C., Churey, J.J., and Worobo, R.W. (2014c). 'Bactericidal thurincin H causes unique morphological changes in *Bacillus cereus* F4552 without affecting membrane permeability', *FEMS microbiology letters*, 357(1), pp. 69–76. doi: 10.1111/1574-6968.12486.
- Wiedemann, I., Benz, R., and Sahl, H.-G. (2004). 'Lipid II-Mediated Pore Formation by the Peptide Antibiotic Nisin: a Black Lipid Membrane Study', *Journal of Bacteriology*, 186(10), pp. 3259–3261. doi: 10.1128/JB.186.10.3259-3261.2004.
- World Health Organization (ed.) (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization (2015a). *Global action plan on antimicrobial resistance*.
- World Health Organization (2015b). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*.
- World Health Organization (2017). *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report 2016-2017*.

Yang, X., and van der Donk, W.A. (2013). 'Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: new insights into the role of leader and core peptides during biosynthesis', *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 19(24), pp. 7662–7677. doi: 10.1002/chem.201300401.

Yano, K., Toki, S., Nakanishi, S., Ochiai, K., Ando, K., Yoshida, M., Matsuda, Y., and Yamasaki, M. (1996). 'MS-271, a novel inhibitor of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces* sp.—I. isolation, structural determination and biological properties of MS-271', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 4(1), pp. 115–120. doi: 10.1016/0968-0896(95)00175-1.

Zhang, Y., Zhu, X., Torelli, A.T., Lee, M., Dzikovski, B., Koralewski, R.M., Wang, E., Freed, J., Krebs, C., Ealick, S.E., et al. (2010). 'Diphthamide biosynthesis requires an Fe-S enzyme-generated organic radical', *Nature*, 465(7300), pp. 891–896. doi: 10.1038/nature09138.

Zheng, G., Yan, L.Z., Vederas, J.C., and Zuber, P. (1999). 'Genes of the *sbo*-*alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin', *Journal of Bacteriology*, 181(23), pp. 7346–7355.

Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., and Bai, Z. (2007). 'New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation', *Environment International*, 33(3), pp. 406–413. doi: 10.1016/j.envint.2006.12.005.

Publication

Publication publiée dans Science advances en septembre 2019 :

Ruminococcin C, a promising antibiotic produced by a human gut symbiont

Steve Chiumento, Clarisse Roblin, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Sybille Tachon, Chloé Leprêtre, Christian Basset, Dwi Adityarini, Hamza Olleik, Cendrine Nicoletti, Olivier Bornet, Olga Iranzo, Marc Maresca, Renaud Hardré, Michel Fons, Thierry Giardina, Estelle Devillard, Françoise Guerlesquin, Yohann Couté, Mohamed Atta, Josette Perrier, Mickael Lafond & Victor Duarte

MICROBIOLOGY

Ruminococcin C, a promising antibiotic produced by a human gut symbiont

Steve Chiumento^{1*}, Clarisse Roblin^{2,3*}, Sylvie Kieffer-Jaquinod^{4*}, Sybille Tachon², Chloé Leprêtre¹, Christian Basset¹, Dwi Aditiyarini¹, Hamza Olleik², Cendrine Nicoletti², Olivier Bernet⁵, Olga Iranzo², Marc Maresca², Renaud Hardré², Michel Fons⁶, Thierry Gardina², Estelle Devillard³, Françoise Guerlesquin⁵, Yohann Couté⁴, Mohamed Atta¹, Josette Perrier², Mickael Lafond^{2†}, Victor Duarte^{1†}

Copyright © 2019 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. Distributed under a Creative Commons Attribution NonCommercial License 4.0 (CC BY-NC).

A major public health challenge today is the resurgence of microbial infections caused by multidrug-resistant strains. Consequently, novel antimicrobial molecules are actively sought for development. In this context, the human gut microbiome is an under-explored potential trove of valuable natural molecules, such as the ribosomally-synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). The biological activity of the sactipeptide subclass of RiPPs remains under-characterized. Here, we characterize an antimicrobial sactipeptide, Ruminococcin C1, purified from the caecal contents of rats mono-associated with *Ruminococcus gnavus* E1, a human symbiont. Its heterologous expression and post-translational maturation involving a specific sactisynthase establish a thioether network, which creates a double-hairpin folding. This original structure confers activity against pathogenic *Clostridia* and multidrug-resistant strains but no toxicity towards eukaryotic cells. Therefore, the Ruminococcin C1 should be considered as a valuable candidate for drug development and its producer strain *R. gnavus* E1 as a relevant probiotic for gut health enhancement.

INTRODUCTION

Over the coming decades, it has been estimated that millions of people will succumb to bacterial infections mainly due to the emergence of multidrug-resistant (MDR) strains (1, 2). As a result, we urgently need to discover novel molecules and means to face this major threat. Bacteria constitute a treasure trove of multiple classes of natural antimicrobial compounds, one of which is ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides (RiPPs). RiPPs are biosynthesized from a genetically encoded precursor peptide, generally containing an N-terminal leader sequence and a C-terminal core peptide (3). Among these peptides, sactipeptides constitute a subclass of bacteriocins that emerged several years ago (4, 5). Despite spectacular advances made with genomic tools, the sactipeptide subclass is currently limited to only six members (Fig. 1A) (6–12). Biosynthesis of most of these peptides relies on the expression of a gene cluster encoding at least one peptide precursor, a maturation enzyme named sactisynthase, which places posttranslational modifications, and two proteins, namely, an ABC transporter and a signal peptidase, which are involved in peptide export and signal peptide cleavage, respectively (Fig. 1B) (13).

In silico analysis of a 15-kb genomic fragment from the strictly anaerobic *Ruminococcus gnavus* E1 strain, a Gram-positive Firmicutes isolated from the feces of a healthy human, indicated a multi-operonic organization controlled by a two-component regulatory system

(i.e., a regulon) (14). In addition to the genes involved in regulation, immunity, and export, the *rumC*-regulon includes five open reading frames (ORFs) (*rumC1* to *rumC5*), which have been suggested to encode sactipeptide precursors (Fig. 1C), two ORFs (*rumMc1* and *rumMc2*) thought to encode sactisynthases (fig. S1A), and one ORF (*rumPc*) likely to encode Ruminococcin C (RumC) leader peptide-specific metallopeptidase from the M16 family (Fig. 1B) (15, 16). Furthermore, previous works showed that *R. gnavus* E1 produces an anti-*Clostridium* substance in the rat gut in a trypsin-dependent manner (17). This substance was later partially purified, identified as RumC isoforms, and shown to be produced exclusively in vivo (15, 18, 19).

From a chemical maturation standpoint, sactisynthases introduce intramolecular thioether cross-links between cysteine sulfur and the unreactive α -carbon of a partner amino acid by a radical-based mechanism to produce sactipeptides (Fig. 1D) (20). All of the sactisynthases characterized so far have been classified in the Radical S-adenosyl-L-methionine (SAM) enzymes superfamily (21). Although their radical SAM domain is known to be directly involved in the formation of the thioether linkage, they all contain a C-terminal extension called SPASM (Subtilosin A/Pyrrroloquinoline quinone/Anaerobic Sulfatase/Mycofactocin maturation enzymes) domain housing additional [4Fe-4S] clusters (22), for which the role is still under debate (12, 23–31). While the number of sactipeptides is still limited, interesting biological properties have been found regarding their antimicrobial activity and their mode of action (5, 8, 32–35).

Here, we report the in vivo and in vitro production of the RumC1 sactipeptide and its functional and conformational characterizations. We highlight the strong antimicrobial activity against Gram-positive pathogens including MDR strains and the lack of toxic effect toward eukaryotic cells. Therefore, it has a valuable potential for drug development, and its producer strain *R. gnavus* E1 could be used as a powerful probiotic.

¹Univ. Grenoble Alpes, CEA, CNRS, CBM-UMR5249, 38000 Grenoble, France. ²Aix-Marseille Univ., CNRS, Centrale Marseille, iSm2, Marseille, France. ³ADISSEO France SAS, Centre d'Expertise et de Recherche en Nutrition, Commeny, France. ⁴Univ. Grenoble Alpes, CEA, INSERM, BGE U1038, 38000 Grenoble, France. ⁵LISM, IMM, Aix-Marseille Univ., CNRS, Marseille, France. ⁶Unité de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines UMR7281, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Aix-Marseille Univ., CNRS, Marseille, France.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: mickael.lafond@univ-amu.fr (M.L.); victor.duarte@cea.fr (V.D.)

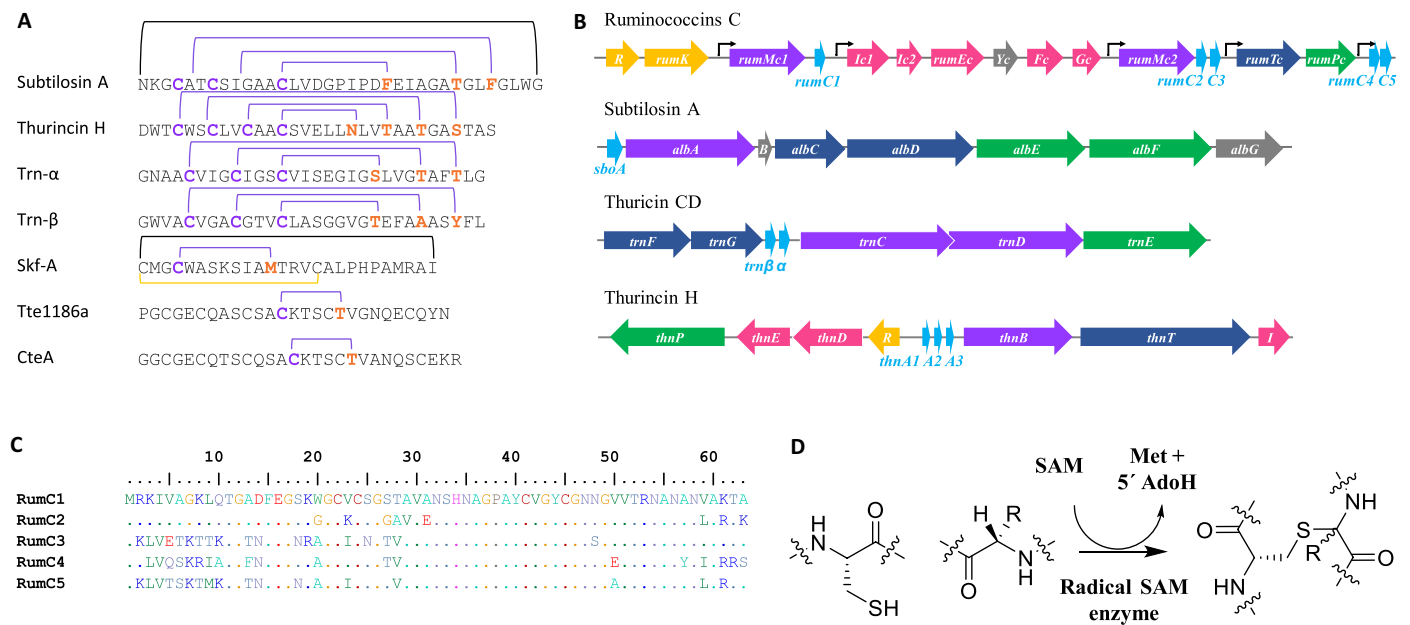


Fig. 1. Biosynthesis of sactipeptides. (A) Thioether network in previously described sactipeptides. Thioether bridges, disulfide bridges, and head-to-tail cyclization are indicated by purple, yellow, and black lines, respectively. (B) Gene regulon encoding ruminococcins C, subtilosin A, thuricin CD, and thuricin H. Purple, radical SAM enzymes; light blue, precursor peptides; dark blue, transporter systems; green, signal peptidases; yellow, response regulators; pink, immunity systems; and gray, genes of unknown function. (C) Alignment of the five RumC peptide isoforms. (D) Thioether bond formation in sactipeptides catalyzed by radical SAM enzymes.

RESULTS

In vivo production and purification of RumC1 from *R. gnavus* E1-monoassociated rats

Crost and co-workers (18) previously showed that when the digestive tract of axenic rats is colonized with *R. gnavus* E1 strain, the feces obtained and the cecal contents display an anti-*Clostridium perfringens* (anti-*Cp*) activity, which is genetically correlated with the *rumC*-regulon (Fig. 1B) (15). Consequently, we began our study by attempting to purify in vivo-produced RumC isoforms. After 12 days of colonization with *R. gnavus* E1, the feces were collected and the cecal contents of monoassociated rats were found to contain an anti-*Cp* substance (Fig. 2A). The expected RumC peptides are 44 amino acid strings after the removal of the supposed N-terminal leader sequence of 19 residues. An ultrafiltration approach based on expected molecular weights was used to enrich peptides of interest in the active fraction (Fig. 2A). The active soluble fraction was then submitted to three consecutive, and optimized chromatographic steps interleaved with desalting steps: cationic exchange, size exclusion, and hydrophobic C18 reversed-phase chromatography. Throughout the subsequent steps, the putative RumC-containing fractions were selected on the basis of an anti-*Cp* assay (Fig. 2A). Nano-liquid chromatography combined with mass spectrometry (LC-MS) analyses revealed a considerable enrichment of the five RumC isoforms in two consecutive fractions of the last purification step (Fig. 2, B and C), which displayed anti-*Cp* activity when combined (Fig. 2A). The masses of the five RumC peptides measured were consistently 8 Da less than their theoretical masses, as shown for in vivo and synthetically produced unmodified RumC1 peptide (Fig. 2, D and F). The iodoacetamide alkylation of the RumC-enriched fraction under reducing conditions failed to alter the observed masses of native RumC1 peptide, suggesting that the four cysteine residues are modified and most likely engaged in intramolecular bonds (Fig. 2E). Unlike the cross-links present in

lantibiotics where thioether bridges are formed between the sulfur atom of a cysteine and the β -carbon of a corresponding residue, the thioether linkages in sactipeptides involve the α -carbon (6, 7). This specificity is thought to result in opening of the thioether link during tandem MS (MS/MS) analyses, leading to the formation of a free cysteine and the dehydrated form of the partner amino acid, resulting in a two unit mass decrease (36). Higher-energy collisional dissociation-based MS/MS analyses of in vivo-produced RumC1 indicated that residues A12, N16, R34, and K42 are involved in thioether bridges (Fig. 3A and table S1). The same strategy was used to study the four remaining RumC peptides, and they were all found to contain four thioether bridges involving residues at the same positions as those identified in RumC1 (fig. S2).

RumC1 presents a novel thioether network

As thioether bridges open during MS/MS analyses, it is impossible to assign the different cysteine residues to their amino acid partners. Thus, we sought to establish a heterologous expression system allowing site-directed mutagenesis to accurately assign the residues involved in each thioether bridge. Furthermore, the in vitro production of RumC bacteriocins will facilitate future investigations including antimicrobial activity assays, structural, functional, and biophysical studies. Similar to the approach described by Himes and co-workers (37) for the production of subtilosin A in *Escherichia coli*, we established a protocol to produce heterologously the mature form of RumC1 (mRumC1), consisting of the leader and core peptide sequences. Here, the genes encoding the radical SAM enzyme RumMc1 and the RumC1 peptide were separately cloned into two different plasmids and co-expressed in the presence of *suf* genes (fig. S3, B and C, top and middle) (38). The observed mass of mRumC1 was in good agreement with the presence of four thioether linkages (Fig. 3B). Reductive alkylation of mRumC1 had no effect on its observed molecular

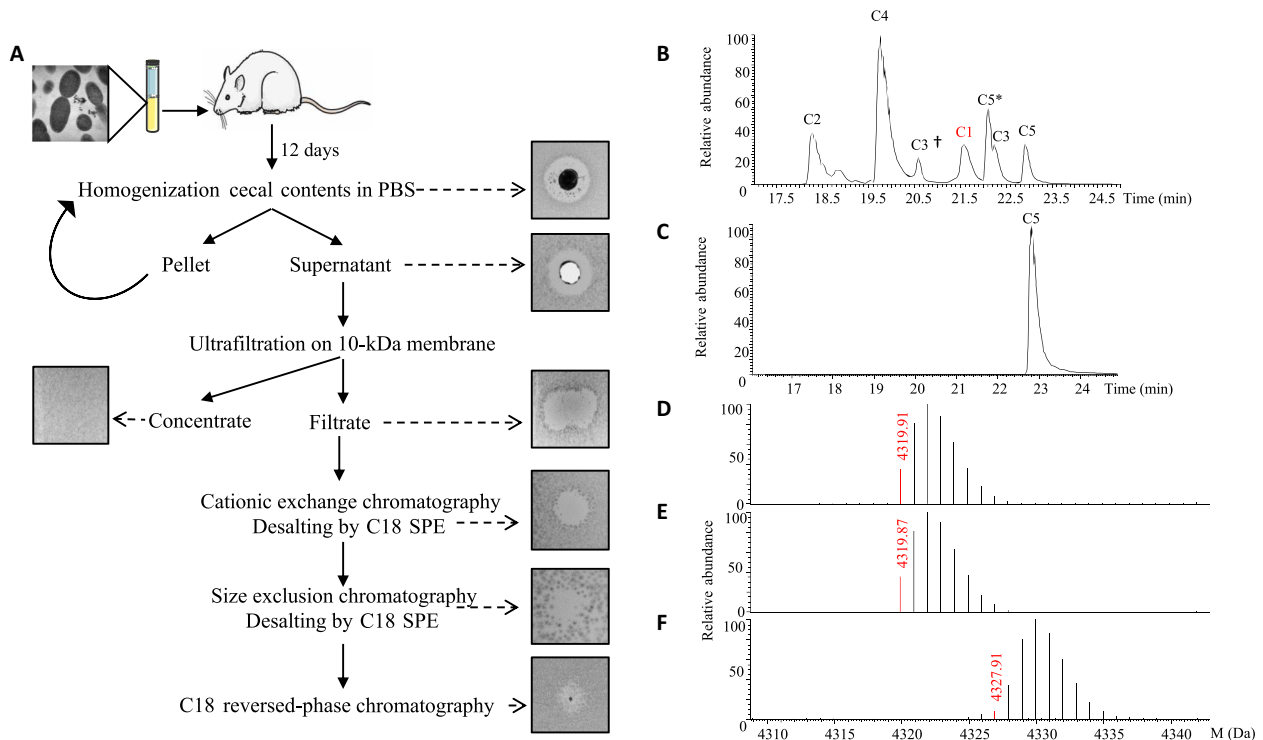


Fig. 2. Purification and characterization of the five RumC isoforms produced in vivo. (A) Protocol for extraction from cecal contents to obtain a purified mixture of RumCs. Fractions were selected on the basis of their anti-Cp activity throughout the purification steps. PBS, phosphate-buffered saline. (B and C) LC-MS analyses of the two fractions containing the different RumC (* and † indicate succinimide and deamidated forms of C5 and C3, respectively). RumC5 was present in two consecutive C18 reversed-phase fractions. (D) Deconvoluted mass spectrum of RumC1 eluted at 21.6 min in nano-LC-MS analyses. (E) Deconvoluted mass spectrum of RumC1 after dithiothreitol (DTT)/iodoacetamide treatment. (F) Deconvoluted mass spectrum of synthetic unmodified RumC1.

weight, thus suggesting that the four Cys residues in mRumC1 are involved in posttranslational modifications (Fig. 3C). LC-MS/MS analyses of mRumC1 confirmed the same four partner residues A, N, R, and K, corresponding to A12, N16, R34, and K42 in RumC1 purified from cecal contents (Fig. 3, A and B). In this sample, two peptide fragments, G(-23)-Y21 and A17-A44, were observed, corresponding to the N- and C-terminal parts, respectively, of mRumC1. Both of these fragments were detected with a 4-Da mass decrease (fig. S4, B and C). In good agreement with this observation, the C-terminal peptide, with a similar 4-Da loss of mass, was also detected in the RumC1-containing fraction from the in vivo preparation (fig. S4A). These important results suggest that mature RumC1 contains four thioether bridges, two each in the N- and C-terminal regions.

To identify the residues involved in each thioether bridge, four Cys to Ala mutants were designed: mRumC1-C3A, mRumC1-C5A, mRumC1-C22A, and mRumC1-C26A. All the mutants were produced and purified as described for mRumC1. To detect nonbridged cysteine residues, mutant mRumC1 samples were first treated with iodoacetamide under reducing conditions and then subjected to LC-MS/MS experiments. Analyses of the four single mutants revealed fairly complex peptide mixtures with many peptide fragments bearing alkylated cysteine residues. These data suggest that, during the maturation of mRumC1, the formation of a single thioether linkage may influence how the three other bridges form, making the structure highly labile. Nevertheless, interesting information can be gleaned from the fragmentation patterns of selected peptides present in the

mixture. We focused our attention on the residues identified as partners of the four cysteines and for which the mass is either unmodified or presents a loss of 2 Da upon mutation of a single cysteine. MS/MS analysis of the Q(-10)-A20 peptide observed in the mRumC1-C3A mutant showed no mass loss on the N16 residue but a 2-Da decrease on A12. These data indicate that a thioether bridge forms between C5 and A12 and that the bridging partner for C3 is N16 (Fig. 3D, fig. S5A, and table S1). In good agreement, peptide F(-5)-A20 from the mRumC1-C5A mutant contains an unmodified A12 residue (Fig. 3D, fig. S5C, and table S1). In the mRumC1-C22A mutant, the fragmentation of the A17-A44 peptide revealed a 2-Da deficit for R34, whereas K42 was unmodified. These observations suggest that R34 and K42 are the partners of C26 and C22, respectively (Fig. 3D, fig. S5B, and table S1). Together, the MS/MS analyses of both wild-type and mutated mRumC1 peptides allowed us to propose a structural model for mature RumC1 in which the peptide is folded into two distinct structured domains both containing two thioether bridges; the two domains are separated by the strictly conserved AGPAY amino acid sequence present in all five RumC isoforms (Fig. 3E).

To establish the connectivity of the thioether rings, nuclear magnetic resonance (NMR) experiments were performed by using a ^{13}C - ^{15}N -labeled mRumC1 sample after removal of the N-terminal leader sequence by trypsin. The [^{15}N , ^1H] heteronuclear single-quantum coherence (HSQC) spectrum gave well-dispersed peaks, with 39 of 42 backbone NH signals observed. The backbone NH signals for C26, G27, and N28 could not be observed. The sequential assignment was made on the basis of the backbone three-dimensional experiments,

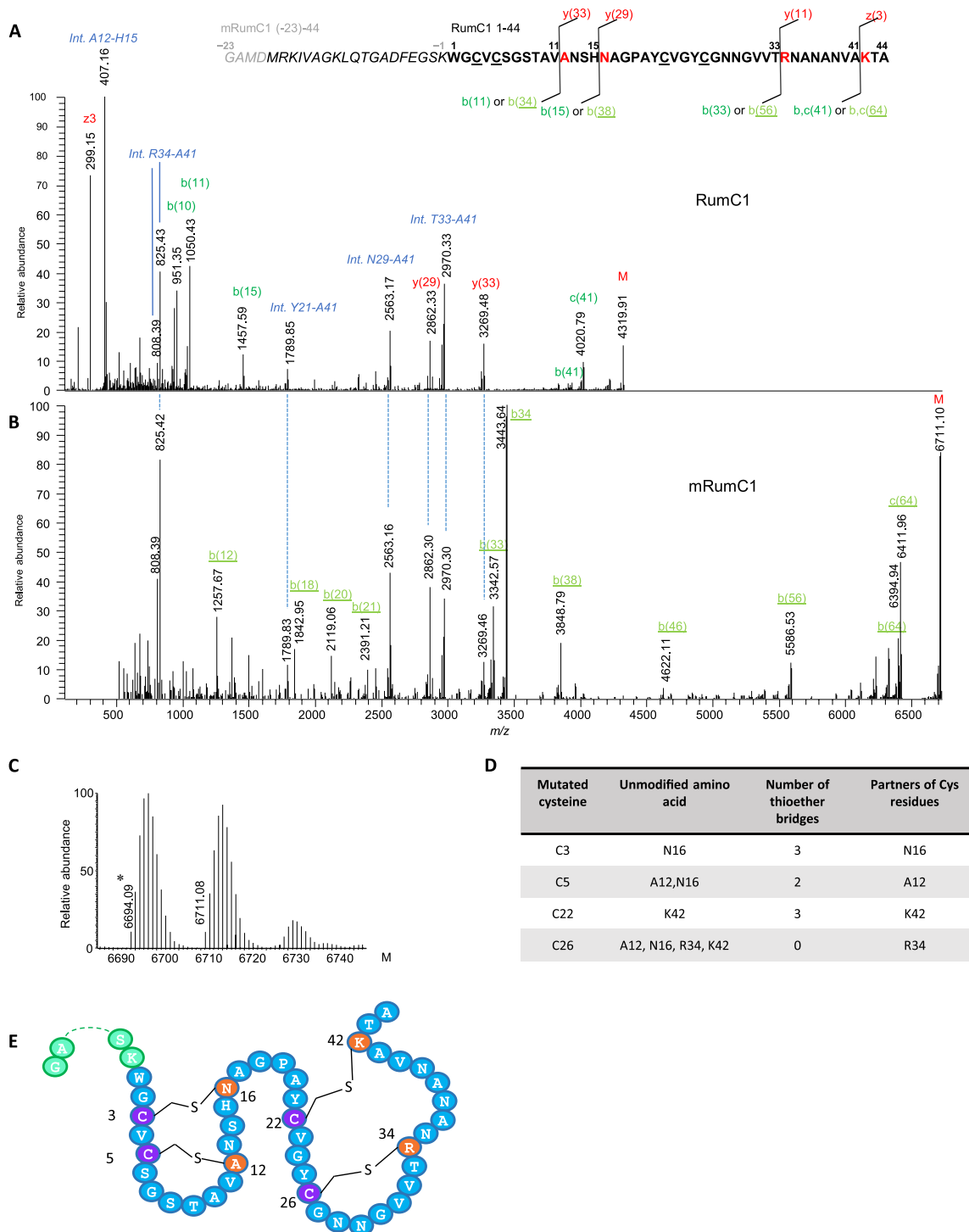


Fig. 3. Tandem mass spectra of mature RumC1 peptide from in vivo and in vitro preparations and thioether network (see table S1 for theoretical and observed masses of interest). (A) Deconvoluted MS/MS spectrum of in vivo-matured RumC1 (1 to 44, bold sequence) showing prominent y/b and c/z fragments induced by breaking of the amide bonds preceding the residues bound to cysteines in thioether bridges. The very structured peptide produced high-intensity and unusual internal fragments (blue italics), particularly ANSH (A12-H15) and RNANANVA (R34-A41), corresponding to fragments located between two linked residues. (B) Deconvoluted MS/MS spectrum of the heterologously matured mRumC1 [containing leader peptide (italics) and four additional GAMD amino acids for cloning purposes (gray italics)], revealing the same characteristic fragmentation pattern. Peaks below 500 Da (identical for the y series of in vivo RumC1) are not shown to improve overall visibility. All masses considered are monoisotopic masses. M (last peak in each spectrum) corresponds to the nonfragmented peptide. (C) Deconvoluted MS spectrum of mRumC1 after DTT/iodoalkylation showing no mass increment. Mass of 6694.09 (ammonia loss) corresponds to a succinimide (*) form produced as a by-product of high-temperature reduction of RumC1hm before iodoalkylation. (D) Identification of bridging partners. (E) Double-hairpin-like structure of mRumC1. Cysteine residues bridged via thioether bonds are shown in purple, and their amino acid partners are indicated in orange.

including HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCA, HN(CO)CA, HNCO, and HN(CA)CO. The chemical shifts of the α -carbons of A12, N16, R34, and K42 were found at 72.2, 68.6, 74.5, and 75.5 parts per million (ppm), respectively (fig. S6A). These values are 15 ppm downfield compared to the average value observed for unmodified residues. This is consistent with the influence of an electronegative atom, such as sulfur, being directly attached. Similar chemical shifts were reported for the modified α -carbon atoms in subtilisin A, thurincin H, and thuricin CD (6–9, 39). Analyses of the total correlation spectroscopy (TOCSY) and ^{13}C TOCSY-HSQC experiments confirmed that A12, N16, R34, and K42 α -carbons are fully substituted, with no α -protons attached. The atomic connectivity of each thioether linkage was determined by analyzing the nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) and ^{15}N NOESY-HSQC data, which show through-space interactions between protons that are close to each other. Nuclear Overhauser effect (NOE) interactions were observed between the β -protons of C3 and the amide proton (HN) of N16, the β -protons of C5 and the HN proton of A12, and the β -protons of C22 and the HN proton of K42 (fig. S6B). These NOE data assigned unambiguously three of the four thioether linkages between C3 and N16, C5 and A12, and C22 and K42. The fourth linkage is not evident to be assigned because of C26 unresolved peak, but only this Cys residue remains to form a thioether bridge with the α -carbon atom of R34 in mRumC1.

Sequential proteolytic cleavage of mRumC1 is required to produce an active form

As we established that in vivo RumC1 and mRumC1 retain the same posttranslational modifications, we performed all subsequent antimicrobial assays using mRumC1. Similar to the chemically synthesized, unmodified form of RumC1, mRumC1 had no anti-*Cp* activity, suggesting that the presence of intramolecular thioether bonds is not sufficient to produce antimicrobial activity (fig. S7A). As a protective strategy for the organisms producing them, RiPPs are in an inactive state until their leader peptide is released as proposed by Yang and van der Donk (40). We therefore decided to remove the leader peptide from mRumC1. After checking the up-regulation of the corresponding mRNA by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction in the cecal contents (fig. S3A), we cloned the *rumPc* gene encoding the putative leader metallopeptidase identified in the *rumC*-regulon to overproduce and purify the recombinant RumPc protein (fig. S3, B and C, bottom). RumPc-treated mRumC1 (i.e., mRumC1c) remained inactive against *Cp* (fig. S7C, top). Moreover, RP-C18 and LC-MS analyses revealed that mRumC1c retains the FEGSK amino acid motif in its N terminus unlike native RumC1 obtained from rat feces (Figs. 2D and 3A and fig. S7, B and C). Because Ramare and co-workers (17) previously reported a trypsin-dependent anti-*Cp* activity in the cecal contents, we next performed proteolytic digestion of mRumC1c by pancreatic trypsin. This sequential treatment led to the complete removal of the leader sequence and generated a mature peptide (i.e., mRumC1cc) identical to in vivo-produced RumC1, as confirmed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and MS analyses, which was active against *Cp* (fig. S7, B and C). In good agreement with these results, direct treatment of mRumC1 with pancreatic trypsin led to the complete removal of the leader peptide sequence within 1 hour (fig. S7D). This one-step cleavage was thus subsequently used to prepare active mRumC1cc, currently renamed RumC1 (fig. S7, A, B and C).

Considering these results, the hydrophobicity profile, and the absence of any kind of signal peptide predicting a subcellular localization

of RumPc, we can propose an in vivo RumC1 maturation process involving (i) an in situ posttranslational modification of the core peptide by RumMc1 followed by a partial cleavage of the leader peptide by RumPc and (ii) an ex situ cleavage of the five remaining N-terminal amino acids of the leader peptide by pancreatic trypsin, leading to an active bacteriocin released in the gut microbiome. To conclude, the intracellular RumPc cleavage followed by the extracellular trypsin cleavage to produce an active form of a sactipeptide represents a perfect example of mutualism between a symbiont and its host collaborating to generate an antipathogenic molecule as a protective strategy for both.

RumC1 is safe for use against pathogens and MDR bacteria

The antimicrobial spectrum of RumC1 was investigated on a broad range of Gram-positive and Gram-negative bacteria, including pathogens and MDR strains. For these studies, we used RumC1 produced by heterologous expression and activated by trypsin cleavage to determine minimal inhibitory concentrations (MICs; Fig. 4A). To distinguish between a bactericidal and a bacteriostatic effect, we also determined the minimal bacteriostatic concentration (MBC) for each sensitive strain (Fig. 4A). RumC1 was highly effective against a range of pathogenic *Clostridium* species with very low MIC and MBC values. An MBC value of 1.56 μM was observed against *Cp*, which is the third cause of foodborne infections in the United States after Norovirus and *Salmonella* spp. according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC). RumC1 is also effective against *Clostridium difficile* (6.25 μM < MBC < 12.5 μM), one of the main pathogens highlighted in the report published by the CDC in 2013 on “Antibiotic Resistance Threats in the United States” and categorized as an urgent threat for which new antibiotics are needed. Even lower MBC value (0.4 μM) was measured for *Clostridium botulinum*, a pathogen responsible for foodborne botulism (via a preformed toxin), infant botulism (intestinal infection via a toxin-forming *C. botulinum*), and wound botulism. Moreover, RumC1 was also active against a range of Gram-positive organisms such as *Staphylococcus aureus* and MDR strains such as vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*, nisin-resistant *Bacillus subtilis* or methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) at clinically relevant MIC values in the micromolar range of 0.8 to 50 μM . As expected, RumC1 was also active against closely phylogenetically related bacteria such as *Clostridium coccoides* with an MIC value of 1.56. Although the antimicrobial assays were performed on a relatively exhaustive panel of bacteria, it seems that RumC1 is not active against Gram-negative bacteria, for which MICs were determined to be >100 μM (Fig. 4A). Last, except for MRSA, the MBC values were identical to the MICs, suggesting that the effect of RumC1 is bactericidal (Fig. 4A).

After assessing the activity spectrum of RumC1, we investigated its mode of action on *Cp* cells. As it is well known that many antimicrobial peptides have a pore-forming effect, we assessed the permeabilization potency of RumC1 following the fluorescent emission of *Cp* cells treated with propidium iodide (PI), a DNA intercalating agent, and the incorporation of the nucleic acid dye SYTOX Green by fluorescence microscopy. Both fluorescent compounds cannot cross undamaged membranes. We used the detergent cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and a well-characterized pore-forming bacteriocin, nisin, as positive controls. Even after 2 hours of treatment, cells exposed to RumC1 showed no PI nor SYTOX Green incorporation, whereas permeabilization with nisin resulted in 59% of the maximum PI incorporation measured with CTAB and caused 97% of the cells to

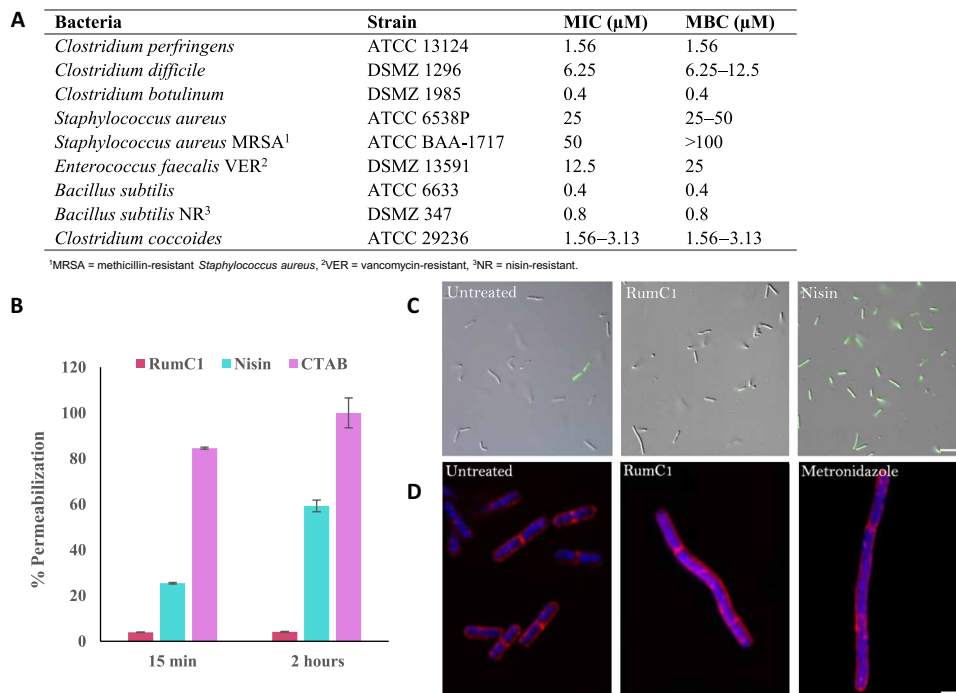


Fig. 4. RumC1 antimicrobial activity. (A) Activity spectrum of RumC1 against selected Gram-positive strains. MIC and MBC were $>100 \mu\text{M}$ for the following Gram-negative strains tested: *Salmonella enterica* (CIP 80.39), *E. coli* (ATCC 8739), *E. coli* MR4 (DSMZ 22314), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *P. aeruginosa* fluoroquinolone resistant (CIP 107398), *Acinetobacter baumannii* (CIP 103572), *A. baumannii* multiresistant (CIP 110431), and *Klebsiella pneumoniae* MR4 (DSMZ 26371). (B and C) Membrane permeabilization assay on *Cp* cells treated with RumC1 or nisin based on measurement of PI incorporation (B) or SYTOX Green staining (C). (B) Cells incubated with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) were used as a positive lysis control, and untreated cells were used as a negative control. (C) Cells were treated for 15 min before staining. Scale bar, 10 μm . (D) Confocal imaging of control *Cp* cells or *Cp* cells treated with RumC1 or metronidazole. Membranes were stained with FM4-64FX, and DNA was stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). RumC1 treatment leads to three morphotypes identical to the ones induced by metronidazole (fig. S9). This figure shows one of these three morphotypes, i.e., one regular cell associated with a cell three to four times longer and with uncondensed DNA throughout the cells with a few spots of highly condensed DNA. Scale bar, 2 μm .

stain positive for SYTOX Green (Fig. 4, B and C). Accordingly, RumC1 is unable to insert into total lipids extracts obtained from *Cp* contrarily to nisin and CTAB (fig. S8). Thus, it appears that, unlike most bacteriocins targeting Gram-positive bacteria, RumC1 does not have a pore-forming action and has most likely an intracellular target. RumC1 can also be expected to be supported by an active membrane transporter to reach the intracellular compartment. Although most peptides acting on intracellular targets are usually active against Gram-negative bacteria and have a much narrower spectrum, some RiPPs such as thiopeptides have a broad spectrum and have been shown to inhibit translation in Gram-positive cells (41). We next tried to identify the cellular pathways inhibited by RumC1 through phenotype imaging experiments based on the “bacterial cytological profiling” method (42) adapted to anaerobic conditions. Membranes and DNA from *Cp* cells were stained with FM4-64FX and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), respectively, and confocal images were acquired. Morphological changes on *Cp* cells induced by treatment with RumC1 were compared to the phenotypes induced by conventional antibiotics with well-characterized mechanisms of action. Treatment with RumC1 produced three morphotypes affecting cell length and organization, as well as DNA condensation (Fig. 4D). No morphological similarities were observed in cultures treated either with antibiotics that inhibited transcription or cell wall synthesis or even with those causing loss of membrane potential (fig. S9, A and B). However, when cells were treated with metronidazole, an antibiotic that inhibits nucleic acid syn-

thesis, we observed the three phenotypes identical to those induced by treatment with RumC1. How metronidazole affects nucleic acid synthesis remains unclear. Studies suggest that it could act directly on DNA and disrupt its structure. Some other studies showed that it indirectly inhibits DNA synthesis and repair systems (e.g., mismatch or SOS), possibly by disrupting the cell redox system resulting in ribonucleotide reductase inhibition (43). Hence, we hypothesize that RumC1 most likely inhibits nucleic acid synthesis in a metronidazole-like manner.

Antimicrobial efficiency not only must be sufficient to develop a therapeutic molecule but also must be safe for the host. We therefore assayed the cytotoxicity of RumC1 on human cells using two intestinal (Caco2 and T84) and one gastric (N87) cell lines. On the basis of their metabolic activity (via resazurin assays), RumC1 did not affect the viability of these cell lines, even at high concentrations of RumC1 [IC_{50} (median inhibitory concentration), $>200 \mu\text{M}$; fig. S10A]. At concentrations of RumC1 up to $200 \mu\text{M}$, metabolic activities of Caco2, N87, and T84 cells were at least 90, 80, and 70%, respectively, of the activity measured in untreated cells. Furthermore, RumC1 induced no hemolysis of human erythrocytes even at high concentrations [EC_{50} (median effective concentration), $>200 \mu\text{M}$; fig. S10B]. Last, no resistance was induced in serial subcultures of *Cp* exposed daily to RumC1, whereas equivalent treatment with metronidazole led to the emergence of resistant bacteria with up to 500-fold higher MICs (fig. S10C). The high potency of RumC1 against pathogenic strains combined with its lack of effect on eukaryotic cells and the absence

of resistance development makes it a relevant candidate either as therapeutic agent or as food safety agent.

DISCUSSION

Through this study, we were able to (i) develop and optimize a protocol to purify a natural molecule exhibiting antibiotic activity produced by a human intestinal symbiont from cecal contents harvested from *R. gnavus* E1–monoassociated rat and (ii) produce an active recombinant form of this RiPP after maturation and sequential and controlled proteolytic cleavage to remove the leader peptide, in line with the steps naturally occurring in the human gut (Fig. 5). For almost all natural RiPPs, the precursor genes encode an unprocessed peptide bearing an N-terminal leader peptide in addition to the C-terminal core peptide. Although leader peptides have been suggested to play multiple roles during RiPPs biosynthesis, such as acting as a secretion signal or as a recognition pattern for the maturation enzymes, the protective effect of keeping the peptide inactive before secretion remains the most notable (3, 44). Several studies on the broad subclasses of RiPPs, the classes II and III lantibiotics (e.g., cytolysin, plantaricin W, haloduracin, lichenicidin, carnolysin, and flavepeptin or NAI-112, respectively) have

reported similarities with a two-step activation process using proteases (45–51). However, despite the five or six amino acid overhangs remaining after the first proteolytic cleavage in mRumC1c, the GG/ or GA/ recognition motif usually found in lantibiotics is not conserved in the leader peptides of RumC isoforms, in favor of an /FE pattern recognized as a cleavage site by RumPc. Broadly, the different classes of lantibiotics, namely, I, II, and III, involve subtilisin-like serine proteases, papain-like cysteine proteases, and Zn-dependent bifunctional (i.e., endo- and aminopeptidase) proteases, respectively, whereas RumPc is a monofunctional Zn-metalloproteinase with an endo-mode of action recognizing an undescribed motif (/FE) to date. In addition, the second step occurring in the maturation process of RumC1 and leading to an active form involves the human pancreatic trypsin. Consequently, we have identified a two-step cleavage process involving a monofunctional Zn-metalloproteinase from the symbiont (i.e., RumPc) and a serine protease from the host organism (i.e., trypsin) to get an active RiPPs. To our knowledge, nothing equivalent has been reported for the RiPPs, especially for the lantibiotic and sactibiotic subclasses (Fig. 5). Last, through a deep MS study on both the natural isoforms of RumC and recombinant forms, we were able to conclude that maturation of the bacteriocin involves a radical SAM sactisynthase,

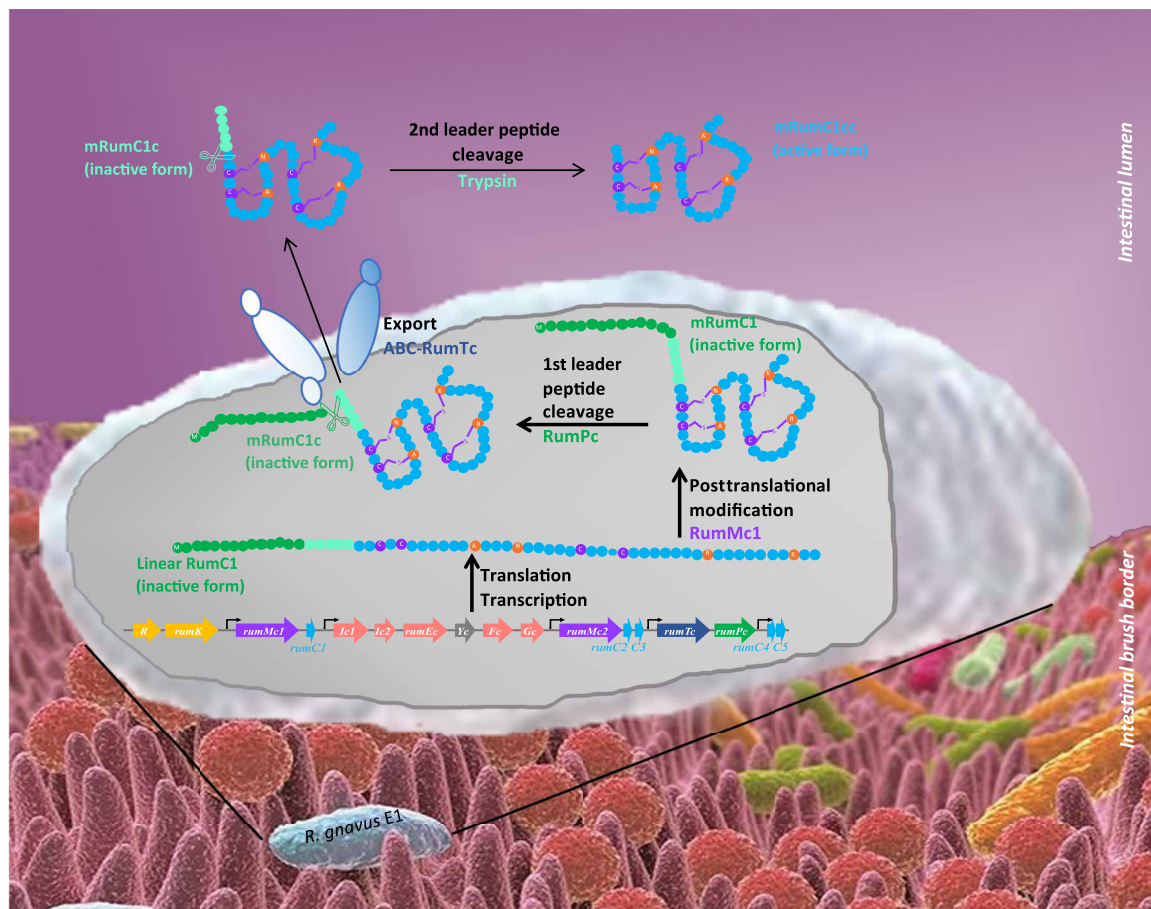


Fig. 5. Proposed mechanism of maturation and activation of RumC1 in the human gut. After induction of the two-component system, conventional transcription, and translation of the gene regulon Ruminococcins C, the intracellular RumC1 maturation process involves (i) an in situ posttranslational modification of the core peptide by RumMc1, leading to the inactive mRumC1; (ii) a partial cleavage of the leader peptide by RumPc, leading to the still inactive mRumC1c; (iii) an export in the intestinal lumen by RumTc; and (iv) an ex situ cleavage of the five remaining N-terminal amino acids of the leader peptide by pancreatic trypsin, leading to an active mRumC1c (i.e., RumC1).

RumMc, itself capable of generating four thioether bridges resulting in a new folding pattern, which has never yet been described in the literature. The discovery of this new double-hairpin structure leads us to propose a new subclass of sactibiotics.

We thoroughly characterized the bactericidal activity of RumC1 and found that, unlike some bacteriocins (e.g., colicine), which are defined as “narrow-spectrum,” RumC1 is active against not only a broad spectrum of Gram-positive bacteria, including phylogenetically *R. gnavus*-related bacteria such as *Cp*, *C. difficile*, and *C. botulinum*, but also more distant bacteria such as *S. aureus*, including MDR strains. Furthermore, our preliminary data suggest a mechanism involving inhibition of nucleic acid synthesis in a metronidazole-like manner, but additional investigation is needed to corroborate this hypothesis. As a result, MICs for RumC1 are in the micromolar range for, e.g., *C. difficile* or *Cp*. Safety assays on several human cell lines revealed no toxicity, and RumC1 does not trigger resistance development unlike many conventional antibiotics. This characteristic is essential when developing new drugs against pathogens considering the rise of MDR strains worldwide. On the basis of all these findings, it is highly relevant to consider RumC for the elaboration of therapeutic strategies, after drug optimization or in combination with other antimicrobial agents or antibiotics, for human or animal health. *Cp* is also a major pathogen affecting poultry, where it causes necrotic enteritis associated with up to 50% mortality (52). Consequently, *R. gnavus* E1 or other RumC-like producing bacteria could be considered as natural probiotics and administered for the prevention against Gram-positive pathogens. Otherwise, sactibiotics and other groups of bacteriocins could be helpful in combinatorial therapies with other antimicrobial agents including, e.g., antibiotics to reduce emergence of resistance or to fight clinical pathogens, and RumC1 could be considered in that way (32).

Last, from an ecological standpoint, the *R. gnavus* E1 and human partnership constitute a perfect example of mutualism where both host and symbiont work together and need each other to produce an active bacteriocin to fight a common enemy: an opportunistic pathogen for the host and a competitive species for the same ecological environment for the symbiont.

MATERIALS AND METHODS

Animals and sample collection

Animal experiments were performed according to the guidelines of the French Ethics Committee, i.e., agreement no. A78-322-6. Axenic male F344 M rats (6 weeks old) provided by the Germ Free Animals facility ANAXEM (Animalerie Axénique de Micalis) platform [Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), UMR 1319 Micalis, France] and maintained on a standard diet during 12 days were inoculated with *R. gnavus* E1 [0.5 ml of late log-phase culture at 10^9 colony-forming units (CFU)/ml] by intragastric route to generate *R. gnavus* E1 monoxenic rats ($n = 10$). After 5 days, individual fecal samples were collected and bacterial counts were estimated by plating serial dilutions of suspensions. We plated these samples on Brain Heart Infusion agar supplemented with yeast extract (5 g/liter) and hemin (5 mg/liter) (BHI-YH), and on Luria-Bertani (LB) agar, under aerobic and anaerobic conditions, to check for the colonization by *R. gnavus* E1 and possible contamination by other bacteria. The animals were sacrificed 12 days after inoculation, and feces and cecal contents were collected. Samples were frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C until RNA or bacteriocin purification.

Bacteriocin purification

Cecal contents of *R. gnavus* E1 monoxenic rats were diluted in phosphate-buffered saline (PBS) (10 g for 30 ml) supplemented with a protease inhibitor cocktail (cOMplete ULTRA tablets EDTA-free, Roche). The suspension was centrifuged at 10,000g for 15 min. Resuspension and centrifugation were repeated twice in half the initial volume of PBS. The three supernatants were pooled and filtered on a polyethersulfone membrane with a 10-kDa cutoff (Merck). The resulting filtrate, containing small molecules including peptides, was submitted to ion exchange chromatography using a Carboxymethyl Sepharose column (GE Healthcare) at 4°C . Elution was performed at 2 ml/min with 20 mM acetate sodium buffer at pH 6.5 under isocratic conditions for 36 min, followed by a linear 0 to 0.5 M sodium chloride gradient for 60 min with a detection at 214 and 280 nm. Elution fractions were desalted by DSC-18-SPE columns (Sigma-Aldrich). Briefly, samples were loaded after dilution (1:1) in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), washed with 0.1% TFA, and eluted in 90% acetonitrile (ACN) and 0.1% TFA before being lyophilized and resuspended in water. Fractions displaying anti-*Cp* activity (as described below) were further purified by size exclusion chromatography using a Superdex 30 Increase column (GE Healthcare). Elution was performed at 4°C at 0.5 ml/min for 120 min under isocratic conditions with PBS, and collected fractions were desalted as described above. Active fractions were then applied to a Jupiter 15- μm C18 300 Å analytical reverse-phase HPLC column (250 mm by 21.2 mm; Phenomenex). Peptides were eluted at 1 ml/min with a 0 to 40% linear gradient of 90% ACN and 0.1% TFA for 30 min before being lyophilized and resuspended in water. The different fractions were maintained at 4°C during all purification steps and stored at -20°C . The protein concentration was estimated either by the Bradford coloration method using a bovine serum albumin standard curve or by measuring the A280 and using the theoretical extinction coefficient of $8480\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Bacteriocin activity assays

To track the presence of the bacteriocin along the purification, samples were tested for their antimicrobial activity against *Cp* at each step using the diffusion assay. If needed, samples were concentrated using a Speed-Vac concentrator (Thermo Fisher Scientific). A 10^{-3} dilution of an overnight culture of *Cp* strain [American Type Culture Collection (ATCC) 13124] was spread on BHI-YH agar. After drying for 30 min at room temperature, wells with a diameter of 6 mm were dug with a Pasteur pipette and 100 μl of sample was added per well. Alternatively, 10 μl was spotted directly onto the plate. The presence of inhibition halos around the samples was examined after incubation of the plates at 37°C for 24 hours under anaerobic conditions.

Expression and purification of MBP-RumC1

A synthetic plasmid containing the *E. coli* codon-optimized gene of *R. gnavus* E1 encoding RumC1 (pETM-40-*rumC1*, kanamycin resistant) was obtained from GenScript (Piscataway, NJ), which allows the expression of a MBP (maltose-binding peptide)-tagged peptide. A tobacco etch virus nuclear-inclusion-a endopeptidase (TEV protease) site was inserted in the linker between MBP and RumC1 peptide. pETM40-*rumC1* was used to transform competent *E. coli* BL21 (DE3) cells for expression. The resulting *E. coli* BL21 (DE3) strain was grown in M9 medium containing kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), vitamin B1 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), MgSO_4 (1 mM), and glucose (4 mg/ml) at 37°C . At an optical density (OD_{600}) of 0.8, the culture was induced using 1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). The temperature was

reduced to 25°C, and the cells were grown for 15 hours under stirring. Cells were then harvested by centrifugation at 4000 rpm for 20 min at 4°C. Cell pellet was suspended in 40 ml of buffer A [50 mM tris (pH 8) and 50 mM NaCl] supplemented with one tablet of a protease inhibitor cocktail (cOmplete, EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets, Roche). Cell pellet was then sonicated, and the lysate was clarified by centrifugation at 40,000 rpm for 40 min at 4°C. The supernatant was collected and passed over Dextrin Sepharose High Performance columns (5 ml; MBPTrap HP, GE Healthcare) coupled to a fast protein liquid chromatography (FPLC) (ÄKTA Purifier 900, ÄKTA FPLC Systems, GE Healthcare). Columns were washed with four column volumes of buffer A. MBP-RumC1 was eluted with buffer B [50 mM tris (pH 8), 50 mM NaCl, and 40 mM maltose]. Fractions containing MBP-RumC1 were pooled and concentrated in a 30,000 molecular weight cutoff (MWCO) filter using Amicon Ultra centrifugal filter devices. The sample was digested by TEV protease for a final TEV protease:MBP-RumC1 ratio of 1:20 (w/w) and incubated for 30 min at room temperature. MBP-tag, TEV protease, and unmodified RumC1 were separated by loading over a HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade column (GE Healthcare) equilibrated in buffer C [50 mM Hepes and 100 mM NaCl (pH 7.5)]. The peptide concentration was estimated by ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopy on a Cary 50 UV-vis spectrophotometer (Varian) by using an extinction coefficient of 8480 M⁻¹ cm⁻¹ at 280 nm.

Heterologous expression and purification of mature mRumC1

A synthetic plasmid containing the *E. coli* codon-optimized gene of *R. gnnavus* E1 encoding RumMc1 (pET-15b-*rumMc1*, ampicillin resistant) was obtained from GenScript. Plasmids pET-15b-*rumMc1*, pETM-40-*rumC1*, and psuf (chloramphenicol resistant) containing *sufABCDSE* genes were used to transform competent *E. coli* BL21 (DE3) cells for expression. The resulting strain was grown in M9 medium containing kanamycin (50 µg/ml), amp (100 µg/ml), chl (34 µg/ml), vitamin B1 (0.5 µg/ml), FeCl₃ (50 µM), MgSO₄ (1 mM), and glucose (4 mg/ml) at 37°C. At an optical density (OD₆₀₀) of 0.8, FeCl₃ (100 µM) and L-cysteine (300 µM) were added and the culture was induced using 1 mM IPTG. The temperature was reduced to 25°C, and the cells were grown for 15 hours under stirring. Cells were then harvested by centrifugation (4000 rpm for 20 min at 4°C). Mature MBP-mRumC1 was then purified as described above for unmodified RumC1.

RumPc production and purification

A synthetic plasmid containing the *E. coli* codon-optimized synthetic gene of *R. gnnavus* encoding RumPc (pET-21a-*rumPc*, ampicillin-resistant) was obtained from GenScript. In silico analysis on the *rumPc*-encoding gene to identify a putative signal peptide was performed by using the SignalP 5.0 server (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/). The plasmid was transformed into thermo-competent BL21 (DE3) *E. coli* cells. Ampicillin-resistant colonies were isolated and subcultured in LB broth. Subcultures were used to inoculate 1 liter of terrific broth (TB) medium supplemented with ampicillin (final concentration, 100 µg/ml). The culture was initiated at OD₆₀₀ = 0.05 in prewarmed medium and incubated at 37°C for 1.5 hours and 28°C for 40 min (until OD₆₀₀ = 0.5). Expression was then induced using 0.5 mM IPTG, and the culture was incubated for 3.5 hours at 28°C. Cells were harvested by centrifugation (5000g, 20 min, 4°C) and frozen at -20°C. Cells were lysed in buffer D [50 mM NaH₂PO₄ (pH 7.5) and 150 mM NaCl] using a cell disrupter (Série TS, CellD, Constant Systems).

The soluble fraction of the cell lysate was retrieved by centrifugation (14,000g, 30 min, 4°C) and filtered at 0.22 µm before being submitted to a 1-ml HisTrap HP purification affinity column (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. RumPc was eluted using a 0 to 500 mM gradient of imidazole. Pooled fractions containing RumPc (detected by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) were ultrafiltered through a PES (polyethersulfone) 10-kDa MWCO membrane and washed 10 times in buffer C. The protein concentration was estimated by measuring the A280 and using an extinction coefficient of 52,425 M⁻¹ cm⁻¹.

mRumC1 leader peptide cleavage

Matured RumC1 obtained by heterologous coexpression of *rumC1* and *rumMc1* genes in *E. coli* and purified as described above was treated with either RumPc or TPCK (*N*-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone)-treated trypsin (Sigma-Aldrich) for 1 hour at 37°C. The molar ratios used were 200:1 for mRumC1:trypsin and 1:5 for mRumC1:RumPc. mRumC1c and mRumC1cc were purified using RP-C18-HPLC with the following gradient: 10 min at 22% followed by 12 min from 22 to 38% of 90% ACN and 0.1% TFA. For the preparation of large amounts of mRumC1cc for biological activity assays, mRumC1 was cleaved with trypsin and purified with the above RP-C18-HPLC conditions on a preparative column (250 mm by 21.2 mm; Phenomenex, Jupiter, 15 µm, 300 Å).

Nano-LC-MS/MS analyses

RumC fractions were generally injected at a concentration of 0.1 µM. Samples were diluted in 5% (v/v) ACN and 0.1% (v/v) TFA and analyzed by online nano-LC-MS/MS (NCS HPLC, Dionex, and Q Exactive HF, Thermo Fisher Scientific). Peptides were sampled on a 300 µm by 5 mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75 µm by 250 mm PepMap C18 column (Dionex). The nano-LC method consisted of a 40 min gradient at a flow rate of 300 nl/min, and MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Fisher Scientific). Highly sensitive method (by increasing the ion time in the trap to 200 ms) in MS/MS was used to improve the signal to noise of the fragmented large peptides. For the analysis of the matured forms, combined high collision dissociation energies of 20 to 27 were used to promote the breaking of both weak bonds (thioether bridge) and stronger bonds (amide bonds). Both MS/MS spectra were summed up to give a combined spectrum. Parallel reaction monitoring experiments were also conducted to target the species of interest.

MS data analyses

Data were processed automatically using Mascot Distiller software (version 2.5.1, Matrix Science) followed by Mascot (version 2.6) searches using the sequences of the different peptides of interest as database. None was chosen as enzyme, and the precisions were set at 10 ppm for the peptide precursor and 20 milli mass unit for the fragments. At first instance, many different possibilities of variable modifications were tested to find out on which amino acid was observed in the dehydratino modification (-2H) (36). Manual annotations were performed in parallel to Mascot searches to assess the positions of thioether linkages. For final searches, dehydratino (A, N, R, and K), deamidation (NQ), and ammonia loss (N) were set as variable modifications. Qual Browser and Xtract (Thermo Fisher Scientific) were used for the display and the deconvolution of the spectra. All considered experimental masses were monoisotopic and nonprotonated masses.

Antimicrobial activity

All targeted strains were grown at 37°C in LB broth under aerobic conditions (200 rpm), except for Clostridia that were grown in BHI-YH under anaerobic conditions (in a Trexler-type anaerobic chamber, without stirring). Peptides dissolved in sterile distilled water were sterilized 2 min under UV light and added to sterile F-bottom polypropylene 96-well microplates from 100 to 0.1 μM. Twofold series dilutions were performed in cell suspension of each bacterial target, including *Cp*, at 10⁻⁴ OD₆₀₀ units. For other Clostridia, higher concentrations of bacteria (i.e., cell suspensions at 10⁻³ OD₆₀₀ units) were used. MIC was defined as the lowest concentration of peptide that inhibited the visible growth of bacteria after 24 to 48 hours incubation at 37°C. Cell suspensions were then plated on appropriate solid medium devoid of any antimicrobial agent to evaluate bacterial growth. MBCs were defined as the lowest concentration of peptide that inhibited the visible growth of bacteria after 24 to 48 hours incubation at 37°C on a solid medium. MICs and MBCs were determined three times. Sterility and growth controls were prepared for each assay.

Membrane permeability assay

Permeabilization of the bacterial membrane by RumC1 was measured using the cell-impermeable DNA/RNA probe PI as previously explained (53, 54). A bacterial culture of *Cp* was grown until it reached 10⁹ bacteria/ml and then centrifuged for 5 min at 300s. Bacteria pellet was then resuspended in sterile PBS in the original volume. PI (Sigma-Aldrich) was then added to the suspension at a final concentration of 60 μM. One hundred microliters of this suspension was then transferred into 96-well black plate (Greiner Bio-One) and treated with RumC1 or nisin at 5× their MIC values. Water and CTAB diluted at 300 μM final concentration were used as negative and positive controls, respectively. After 15- and 120-min incubations at 37°C under anaerobic conditions, fluorescence was measured (excitation at 530 nm and emission at 590 nm) using a microplate reader (Synergy Mx, BioTek). Results were expressed as the percentage of total permeabilization obtained by treatment with CTAB. All experiments were done in triplicate. For the permeabilization assay with SYTOX Green (Thermo Fisher Scientific), an overnight culture of *Cp* was diluted at 1:100 in BHI-YH and grown at 37°C under anaerobic conditions until OD₆₀₀ = 0.2. Cells were then treated with RumC1 or nisin at 5× their MIC values for 15 min before being stained with SYTOX Green at 0.5 μM. Then, cells were rinsed with Hanks' balanced salt solution +/- (Gibco) and resuspended in VECTASHIELD (Vector Laboratories, CliniSciences H-1000). Observations were lastly performed with a Leitz DMRB microscope (Leica), equipped with a Leica DFC 450C camera.

Study of the mode of action based on phenotype imaging by confocal microscopy

Phenotype observations by confocal microscopy were used to evaluate the mode of action of RumC1, as previously described (42) but with some modifications. An overnight culture of *Cp* was diluted at 1:100 in BHI-YH and grown at 37°C under anaerobic conditions until OD_{600nm} = 0.2. Bacteria were then treated with RumC1 or antibiotics with known mechanisms of action (fig. S7) at 5× their MIC values for 2 hours. Then, membranes were stained with FM4-64FX (Thermo Fisher Scientific), and DNA was stained with DAPI (Sigma-Aldrich) at final concentrations of 12 and 2 μg/ml, respectively, for 10 min on ice. Cells were then pelleted (7500 rpm, 30 s) and washed with cold PBS. Cells were fixed with 4% cold paraformaldehyde for 15 min on ice before being washed

with cold PBS again. Last, cells were resuspended in VECTASHIELD, and 8 μl was transferred onto microscope glass slides. Images were collected using an IX71 FluoView confocal microscope (Olympus, Rungis, France) for DAPI laser/filter ExWave = "405"/EmWave = "461" and for FM4-64FX laser/filter ExWave = "543"/EmWave = "618."

Cytotoxic assays

The intestinal toxicity of RumC1 was evaluated on human cell lines, with NCI-N87 (ATCC CRL-5822), Caco-2 (ATCC HTB-37), and T84 (ATCC CCL-248) being used as models of human gastric, small intestinal, and colonic epithelial cells, respectively. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, and 1% streptomycin-penicillin antibiotics (all from Invitrogen). Cells were routinely seeded and grown onto 25-cm² flasks maintained in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Before cytotoxicity assay, cells grown on 25-cm² flasks were detached using trypsin-EDTA solution (Thermo Fisher Scientific), counted using Malassez counting chamber, and seeded into 96-well cell culture plates (Greiner Bio-One) at approximately 104 cells per well. The cells were left to reach confluence for 48 to 72 hours at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Plates were then aspirated, and increasing concentrations of RumC1 (final concentrations ranging from 0 to 200 μM) diluted in culture medium were added to the cells for 48 hours at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Sterile water was used as a negative control. At the end of the incubation, wells were empty and cell viability was evaluated using a resazurin-based in vitro toxicity assay kit (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions (55). Briefly, wells were aspirated and filled with 100 μl of diluted resazurin solution obtained by dilution of the resazurin stock solution (1:100) in sterile PBS containing calcium and magnesium [PBS++ (pH 7.4), Thermo Fisher Scientific]. After 4 hours of incubation at 37°C, fluorescence intensity was measured using a microplate reader (Synergy Mx, BioTek) with an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. The fluorescence values were normalized by the control and expressed as the percentage of cell viability. All experiments were done in triplicate.

Hemolytic activity assay

The hemolytic activity of RumC1 was evaluated as previously described (53, 56, 57). Briefly, human erythrocytes (obtained from DivBioScience, NL) were pelleted by centrifugation at 800g for 5 min. Cell pellet was then resuspended in sterile PBS and centrifuged at 800g for 5 min. This step was repeated three times, and erythrocytes were lastly resuspended in PBS at a concentration of 8%. One hundred microliters were then added per well of sterile 96-well microplates (Greiner Bio-One) containing 100 μl of PBS with increasing concentrations of RumC1 (final concentrations ranging from 0 to 200 μM) obtained by twofold serial dilutions. Sterile water and Triton X-100 diluted in PBS at 0.1% (v/v) were used as negative and positive controls, respectively. After 1 hour at 37°C, the microplates were centrifuged at 800g for 5 min. One hundred microliters of cell supernatants was collected and transferred to a new 96-well microplate, and OD_{405nm} was measured using a microplate reader (Synergy Mx, BioTek). Hemolysis caused by RumC1 was expressed as the percentage of total hemolysis given by treatment with Triton X-100 at 0.1%. All experiments were done in triplicate.

Induction of resistance

Cp cells were incubated with RumC1 or metronidazole as described above for MIC determination. After 24 hours of incubation, the well

with the highest concentration of peptide or antibiotic showing visible growth was used to inoculate a new culture that was then treated again. These steps were repeated daily for 30 days to follow MIC changes.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <http://advances.sciencemag.org/cgi/content/full/5/9/eaaw9969/DC1>

Supplementary Methods

Fig. S1. Multi-alignment of RumMc radical SAM enzymes.

Fig. S2. Tandem mass spectra of RumC2-5 purified from cecal contents.

Fig. S3. Gene expression in the gut of rats monoassociated with *R. gnavus* E1 and heterologous expression and purification of MBP-mRumC1, mRumC1, and RumPc.

Fig. S4. Tandem mass spectra of N- and C-terminal fragments of RumC1 peptide present in vivo and in vitro samples.

Fig. S5. Tandem mass spectra of mRumC1 mutants from which the residues involved in each thioether bridge were attributed.

Fig. S6. Determination of the connectivity of the thioether linkages in RumC1 by NMR.

Fig. S7. Cleavage of the leader N-terminal peptides of mRumC1 and anti-Cp activity assays.

Fig. S8. Evaluation of the ability of RumC1 to insert into bacterial lipids.

Fig. S9. Bacterial cytological profiling against Cp.

Fig. S10. Assessing RumC1 safety.

Table S1. Theoretical and experimental spectra lists.

References (58, 59)

REFERENCES AND NOTES

- A. J. O'Neill, New antibacterial agents for treating infections caused by multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Expert Opin. Investig. Drugs* **17**, 297–302 (2008).
- J. O'Neill, *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations* (Review on Antimicrobial Resistance, 2016).
- P. G. Arnison, M. J. Bibb, G. Bierbaum, A. A. Bowers, T. S. Bugni, G. Bulaj, J. A. Camarero, D. J. Campopiano, G. L. Challis, J. Clardy, P. D. Cotter, D. J. Craik, M. Dawson, E. Dittmann, S. Donadio, P. C. Dorresteijn, K.-D. Entian, M. A. Fischbach, J. S. Garavelli, U. Göransson, C. W. Gruber, D. H. Haft, T. K. Hemscheidt, C. Hertweck, C. Hill, A. R. Horswill, M. Jaspars, W. L. Kelly, J. P. Klinman, O. P. Kuipers, A. J. Link, W. Liu, M. A. Marahiel, D. A. Mitchell, G. N. Moll, B. S. Moore, R. Müller, S. K. Nair, I. F. Nes, G. E. Norris, B. M. Olivera, H. Onaka, M. L. Patchett, J. Piel, M. J. T. Reaney, S. Rebuffat, R. P. Ross, H.-G. Sahl, E. W. Schmidt, M. E. Selsted, K. Severinov, B. Shen, K. Sivonen, L. Smith, T. Stein, R. D. Süßmuth, J. R. Tagg, G.-L. Tang, A. W. Truman, J. C. Vederas, C. T. Walsh, J. D. Walton, S. C. Wenzel, J. M. Willey, W. A. van der Donk, Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* **30**, 108–160 (2013).
- M. C. Rea, R. P. Ross, P. D. Cotter, C. Hill, Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria, in *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From genes to Applications*, D. Drider, S. Rebuffat, Eds. (Springer, 2011), pp. 29–53.
- H. Mathur, M. C. Rea, P. D. Cotter, C. Hill, R. P. Ross, The sactibiotic subclass of bacteriocins: An update. *Curr. Protein Pept. Sci.* **16**, 549–558 (2015).
- K. Kawulka, T. Sprules, R. T. McKay, P. Mercier, C. M. Diaper, P. Zuber, J. C. Vederas, Structure of subtilisin A, an antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual posttranslational modifications linking cysteine sulfurs to α -carbons of phenylalanine and threonine. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4726–4727 (2003).
- K. E. Kawulka, T. Sprules, C. M. Diaper, R. M. Whittall, R. T. McKay, P. Mercier, P. Zuber, J. C. Vederas, Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual sulfur to α -carbon cross-links: Formation and reduction of α -thio- α -amino acid derivatives. *Biochemistry* **43**, 3385–3395 (2004).
- M. C. Rea, C. S. Sit, E. Clayton, P. M. O'Connor, R. M. Whittall, J. Zheng, J. C. Vederas, R. P. Ross, C. Hill, Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 9352–9357 (2010).
- C. S. Sit, M. J. van Belkum, R. T. McKay, R. W. Worobo, J. C. Vederas, The 3D solution structure of thurincin H, a bacteriocin with four sulfur to α -carbon crosslinks. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**, 8718–8721 (2011).
- W.-T. Liu, Y.-L. Yang, Y. Xu, A. Lamsa, N. M. Haste, J. Y. Yang, J. Ng, D. Gonzalez, C. D. Ellermeier, P. D. Straight, P. A. Pevzner, J. Pogliano, V. Nizet, K. Pogliano, P. C. Dorresteijn, Imaging mass spectrometry of intraspecies metabolic exchange revealed the cannibalistic factors of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 16286–16290 (2010).
- N. A. Bruender, J. Wilcoxon, R. D. Britt, V. Bandarian, Biochemical and spectroscopic characterization of a radical S-adenosyl-L-methionine enzyme involved in the formation of a peptide thioether cross-link. *Biochemistry* **55**, 2122–2134 (2016).
- T. L. Grove, P. M. Himes, S. Hwang, H. Yumerefendi, J. B. Bonanno, B. Kuhlman, S. C. Almo, A. A. Bowers, Structural insights into thioether bond formation in the biosynthesis of sactipeptides. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 11734–11744 (2017).
- G. A. Hudson, D. A. Mitchell, RiPP antibiotics: Biosynthesis and engineering potential. *Curr. Opin. Microbiol.* **45**, 61–69 (2018).
- M. G. Lamarche, B. L. Wanner, S. Crépin, J. Harel, The phosphate regulon and bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 461–473 (2008).
- A. Pujol, E. H. Crost, G. Simon, V. Barbe, D. Vallenet, A. Gomez, M. Fons, Characterization and distribution of the gene cluster encoding RumC, an anti-*Clostridium perfringens* bacteriocin produced in the gut. *FEMS Microbiol. Ecol.* **78**, 405–415 (2011).
- N. D. Rawlings, A. J. Barrett, P. D. Thomas, X. Huang, A. Bateman, R. D. Finn, The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* **46**, D624–D632 (2018).
- F. Ramare, J. Nicoli, J. Dabard, T. Corring, M. Ladire, A. M. Gueugneau, P. Raibaud, Trypsin-dependent production of an antibacterial substance by a human *Peptostreptococcus* strain in gnotobiotic rats and in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2876–2883 (1993).
- E. H. Crost, E. H. Ajandouz, C. Villard, P. A. Geraert, A. Puigserver, M. Fons, Ruminococcin C, a new anti-*Clostridium perfringens* bacteriocin produced in the gut by the commensal bacterium *Ruminococcus gnavus* E1. *Biochimie* **93**, 1487–1494 (2011).
- E. H. Crost, A. Pujol, M. Ladire, J. Dabard, P. Raibaud, J. P. Carlier, M. Fons, Production of an antibacterial substance in the digestive tract involved in colonization-resistance against *Clostridium perfringens*. *Anaerobe* **16**, 597–603 (2010).
- L. Flühe, M. A. Marahiel, Radical S-adenosylmethionine enzyme catalyzed thioether bond formation in sactipeptide biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 605–612 (2013).
- J. B. Broderick, B. R. Duffus, K. S. Duschene, E. M. Shepard, Radical S-adenosylmethionine enzymes. *Chem. Rev.* **114**, 4229–4317 (2014).
- T. A. J. Grell, P. J. Goldman, C. L. Drennan, SPASM and twitch domains in S-adenosylmethionine (SAM) radical enzymes. *J. Biol. Chem.* **290**, 3964–3971 (2015).
- L. Flühe, T. A. Knappe, M. J. Gattner, A. Schäfer, O. Burghaus, U. Linne, M. A. Marahiel, The radical SAM enzyme AlbA catalyzes thioether bond formation in subtilisin A. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 350–357 (2012).
- B. M. Wiekowski, J. D. Hegemann, A. Mielcarek, L. Boss, O. Burghaus, M. A. Marahiel, The PqqD homologous domain of the radical SAM enzyme ThnB is required for thioether bond formation during thurincin H maturation. *FEBS Lett.* **589**, 1802–1806 (2015).
- L. Flühe, O. Burghaus, B. M. Wiekowski, T. W. Giessen, U. Linne, M. A. Marahiel, Two [4Fe-4S] clusters containing radical SAM enzyme SkfB catalyze thioether bond formation during the maturation of the sporulation killing factor. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 959–962 (2013).
- N. A. Bruender, V. Bandarian, SkfB abstracts a hydrogen atom from C α on SkfA to initiate thioether cross-link formation. *Biochemistry* **55**, 4131–4134 (2016).
- L. M. Walker, W. M. Kincannon, V. Bandarian, S. J. Elliott, Deconvoluting the reduction potentials for the three [4Fe-4S] clusters in an AdoMet radical SCIFF maturase. *Biochemistry* **57**, 6050–6053 (2018).
- W. M. Kincannon, N. A. Bruender, V. Bandarian, A radical clock probe uncouples H atom abstraction from thioether cross-link formation by the radical S-adenosyl-L-methionine enzyme SkfB. *Biochemistry* **57**, 4816–4823 (2018).
- T. A. J. Grell, W. M. Kincannon, N. A. Bruender, E. J. Blaesi, C. Krebs, V. Bandarian, C. L. Drennan, Structural and spectroscopic analyses of the sporulation killing factor biosynthetic enzyme SkfB, a bacterial AdoMet radical sactisynthase. *J. Biol. Chem.* **293**, 17349–17361 (2018).
- A. Benjdia, C. Balty, O. Berteau, Radical SAM enzymes in the biosynthesis of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). *Front. Chem.* **5**, 87 (2017).
- A. Benjdia, A. Guillot, B. Lefranc, H. Vaudry, J. Leprince, O. Berteau, Thioether bond formation by SPASM domain radical SAM enzymes: C α H-atom abstraction in subtilisin A biosynthesis. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **52**, 6249–6252 (2016).
- H. Mathur, V. Fallico, P. M. O'Connor, M. C. Rea, P. D. Cotter, C. Hill, R. P. Ross, Insights into the mode of action of the sactibiotic thuricin CD. *Front. Microbiol.* **8**, 696 (2017).
- G. Wang, D. C. Manns, G. K. Guron, J. J. Churey, R. W. Worobo, Large-scale purification, characterization, and spore outgrowth inhibitory effect of thurincin H, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **6**, 105–113 (2014).
- C. E. Shelburne, F. Y. An, V. Dholpe, A. Ramamoorthy, D. E. Lopatin, M. S. Lantz, The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilisin A. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 297–300 (2006).
- J. E. González-Pastor, E. C. Hobbs, R. Losick, Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* **301**, 510–513 (2003).
- C. T. Lohans, J. C. Vederas, Structural characterization of thioether-bridged bacteriocins. *J. Antibiot.* **67**, 23–30 (2014).

37. P. M. Himes, S. E. Allen, S. Hwang, A. A. Bowers, Production of Sactipeptides in *Escherichia coli*: Probing the substrate promiscuity of subtilisin a biosynthesis. *ACS Chem. Biol.* **11**, 1737–1744 (2016).
38. B. Roche, L. Aussel, B. Ezraty, P. Mandin, B. Py, F. Barras, Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: Formation, regulation and diversity. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 455–469 (2013).
39. C. S. Sit, R. T. McKay, C. Hill, R. P. Ross, J. C. Vederas, The 3D structure of thuricin CD, a two-component bacteriocin with cysteine sulfur to α -carbon cross-links. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 7680–7683 (2011).
40. X. Yang, W. A. van der Donk, Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: New insights into the role of leader and core peptides during biosynthesis. *Chem. A Eur. J.* **19**, 7662–7677 (2013).
41. M. C. Bagley, J. W. Dale, E. A. Merritt, X. Xiong, Thiopeptide antibiotics. *Chem. Rev.* **105**, 685–714 (2005).
42. P. Nonejuie, M. Burkart, K. Pogliano, J. Pogliano, Bacterial cytological profiling rapidly identifies the cellular pathways targeted by antibacterial molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 16169–16174 (2013).
43. S. A. Dingsdag, N. Hunter, Metronidazole: An update on metabolism, structure–cytotoxicity and resistance mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 265–279 (2018).
44. T. J. Oman, W. A. van der Donk, Follow the leader: The use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 9–18 (2010).
45. M. C. Booth, C. P. Bogie, H. G. Sahl, R. J. Siezen, K. L. Hatter, M. S. Gilmore, Structural analysis and proteolytic activation of *Enterococcus faecalis* cytolysin, a novel lantibiotic. *Mol. Microbiol.* **21**, 1175–1184 (1996).
46. A. L. McClerren, L. E. Cooper, C. Quan, P. M. Thomas, N. L. Kelleher, W. A. van der Donk, Discovery and in vitro biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 17243–17248 (2006).
47. M. Begley, P. D. Cotter, C. Hill, R. P. Ross, Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 5451–5460 (2009).
48. S. Chen, B. Xu, E. Chen, J. Wang, J. Lu, S. Donadio, H. Ge, H. Wang, Zn-dependent bifunctional proteases are responsible for leader peptide processing of class III lanthipeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**, 2533–2538 (2019).
49. G. H. Völler, B. Krawczyk, P. Enslé, R. D. Süßmuth, Involvement and unusual substrate specificity of a prolyl oligopeptidase in class III lanthipeptide maturation. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 7426–7429 (2013).
50. C. T. Lohans, J. L. Li, J. C. Vederas, Structure and biosynthesis of carnolysin, a homologue of enterococcal cytolysin with D-amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 13150–13153 (2014).
51. H. Holo, Z. Jeknic, M. Daeschel, S. Stevanovic, I. F. Nes, Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology* **147**, 643–651 (2001).
52. F. V. Immerseel, J. D. Buck, F. Pasmans, G. Huyghebaert, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, *Clostridium perfringens* poultry: An emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* **33**, 537–549 (2004).
53. L. B. Oyama, S. E. Girdwood, A. R. Cookson, N. Fernandez-Fuentes, F. Privé, H. E. Vallin, T. J. Wilkinson, P. N. Golyshin, O. V. Golyshina, R. Mikut, K. Hilpert, J. Richards, M. Wootton, J. E. Edwards, M. Maresca, J. Perrier, F. T. Lundy, Y. Luo, M. Zhou, M. Hess, H. C. Mantovani, C. J. Creevey, S. A. Huws, The rumen microbiome: An underexplored resource for novel antimicrobial discovery. *NPJ Biofilms Microbiomes.* **3**, 33 (2017).
54. E. Di Pasquale, C. Salmi-Smail, J.-M. Brunel, P. Sanchez, J. Fantini, M. Maresca, Biophysical studies of the interaction of squalamine and other cationic amphiphilic molecules with bacterial and eukaryotic membranes: Importance of the distribution coefficient in membrane selectivity. *Chem. Phys. Lipids* **163**, 131–140 (2010).
55. C. Borie, S. Mondal, T. Arif, M. Briand, H. Lingua, F. Dumur, D. Gignes, P. Stocker, B. Barbarat, V. Robert, C. Nicoletti, D. Olive, M. Maresca, M. Nechab, Eneidiynes bearing polyfluoroaryl sulfoxide as new antiproliferative agents with dual targeting of microtubules and DNA. *Eur. J. Med. Chem.* **148**, 306–313 (2018).
56. A. Tardy, J.-C. Honoré, J. Tran, D. Siri, V. Delplace, I. Bataille, D. Letourneur, J. Perrier, C. Nicoletti, M. Maresca, C. Lefay, D. Gignes, J. Nicolas, Y. Guillauneuf, Radical copolymerization of vinyl ethers and cyclic ketene acetals as a versatile platform to design functional polyesters. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 16515–16520 (2017).
57. B. T. Benkhaled, S. Hadiouch, H. Olleik, J. Perrier, C. Ysacco, Y. Guillauneuf, D. Gignes, M. Maresca, C. Lefay, Elaboration of antimicrobial polymeric materials by dispersion of well-defined amphiphilic methacrylic SG1-based copolymers. *Polym. Chem.* **9**, 3127–3141 (2018).
58. K. J. Livak, T. D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
59. W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis: A practical approach* (Oxford University Press, 2000).

Acknowledgments: We would like to thank the people from the AVB platform (iSm2 CNRS, UMR 7313, Marseille) and the “ANAXEM platform” animal facility (Micalis INRA Jouy en Josas, France). We are indebted to S. Rabot (INRA) for providing the axenic and monoassociated rats and A. Balvay for skillful technical assistance. **Funding:** This study was supported by grants from the French National Agency for Research (“Agence Nationale de la Recherche”) through the “Projet de Recherche Collaboratif” (RUMBA project, ANR-15-CE21-0020), the “Investissement d’Avenir Infrastructures Nationales en Biologie et Santé” programme (ProFI project, ANR-10-INBS-08), and partial financial support from the Labex ARCANE and CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003). We are grateful to Adisseo France company and the Association Nationale Recherche Technologie (ANRT) for funding the doctoral fellowship of C.R. entitled “Bacteriocins RumC, a novel antimicrobial peptide family as alternative to conventional antibiotics.” This grant numbered Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) no. 2016/0657 runs from 1 March 2017 to 1 March 2020. **Author contributions:** S.C., C.R., C.L., C.B., D.A., O.B., and S.T. performed the in vitro and in vivo assays for RumC1, RumMc1, and RumPc and were involved in interpreting the data and writing the manuscript. S.K.-J. and Y.C. performed the nano-LC-MS/MS characterizations and were involved in writing the manuscript. H.O. and M.M. performed the cytotoxicity assays. C.N. performed the confocal microscopy experiments. O.I. and R.H. performed the peptide chemical synthesis. T.G., E.D., F.G., and M.F. were involved in the study design. M.A., M.L., J.P., and V.D. conceptualized the study, designed the experiments, and wrote the manuscript. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials. Additional data related to this paper may be requested from authors.

Submitted 13 February 2019
Accepted 27 August 2019
Published 25 September 2019
10.1126/sciadv.aaw9969

Citation: S. Chiumento, C. Roblin, S. Kieffer-Jaquinod, S. Tachon, C. Leprêtre, C. Basset, D. Adityarini, H. Olleik, C. Nicoletti, O. Bornet, O. Iranzo, M. Maresca, R. Hardré, M. Fons, T. Giardina, E. Devillard, F. Guerlesquin, Y. Couté, M. Atta, J. Perrier, M. Lafond, V. Duarte, Ruminococcin C, a promising antibiotic produced by a human gut symbiont. *Sci. Adv.* **5**, eaaw9969 (2019).

Ruminococcin C, a promising antibiotic produced by a human gut symbiont

Steve Chiumento, Clarisse Roblin, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Sybille Tachon, Chloé Leprêtre, Christian Basset, Dwi Adityarini, Hamza Olléik, Cendrine Nicoletti, Olivier Bornet, Olga Iranzo, Marc Maresca, Renaud Hardré, Michel Fons, Thierry Giardina, Estelle Devillard, Françoise Guerlesquin, Yohann Couté, Mohamed Atta, Josette Perrier, Mickael Lafond and Victor Duarte

Sci Adv 5 (9), eaaw9969.
DOI: 10.1126/sciadv.aaw9969

ARTICLE TOOLS	http://advances.sciencemag.org/content/5/9/eaaw9969
SUPPLEMENTARY MATERIALS	http://advances.sciencemag.org/content/suppl/2019/09/23/5.9.eaaw9969.DC1
REFERENCES	This article cites 56 articles, 10 of which you can access for free http://advances.sciencemag.org/content/5/9/eaaw9969#BIBL
PERMISSIONS	http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

Supplementary Materials for

Ruminococcin C, a promising antibiotic produced by a human gut symbiont

Steve Chiumento, Clarisse Roblin, Sylvie Kieffer-Jaquinod, Sybille Tachon, Chloé Leprêtre, Christian Basset, Dwi Adityarini, Hamza Olleik, Cendrine Nicoletti, Olivier Bornet, Olga Iranzo, Marc Maresca, Renaud Hardré, Michel Fons, Thierry Giardina, Estelle Devillard, Françoise Guerlesquin, Yohann Couté, Mohamed Atta, Josette Perrier, Mickael Lafond*, Victor Duarte*

*Corresponding author. Email: mickael.lafond@univ-amu.fr (M.L.); victor.duarte@cea.fr (V.D.)

Published 25 September 2019, *Sci. Adv.* **5**, eaaw9969 (2019)
DOI: 10.1126/sciadv.aaw9969

The PDF file includes:

Supplementary Methods

Fig. S1. Multi-alignment of RumMc radical SAM enzymes.

Fig. S2. Tandem mass spectra of RumC2-5 purified from cecal contents.

Fig. S3. Gene expression in the gut of rats monoassociated with *R. gnavus* E1 and heterologous expression and purification of MBP-mRumC1, mRumC1, and RumPc.

Fig. S4. Tandem mass spectra of N- and C-terminal fragments of RumC1 peptide present in in vivo and in vitro samples.

Fig. S5. Tandem mass spectra of mRumC1 mutants from which the residues involved in each thioether bridge were attributed.

Fig. S6. Determination of the connectivity of the thioether linkages in RumC1 by NMR.

Fig. S7. Cleavage of the leader N-terminal peptides of mRumC1 and anti-*Cp* activity assays.

Fig. S8. Evaluation of the ability of RumC1 to insert into bacterial lipids.

Fig. S9. Bacterial cytological profiling against *Cp*.

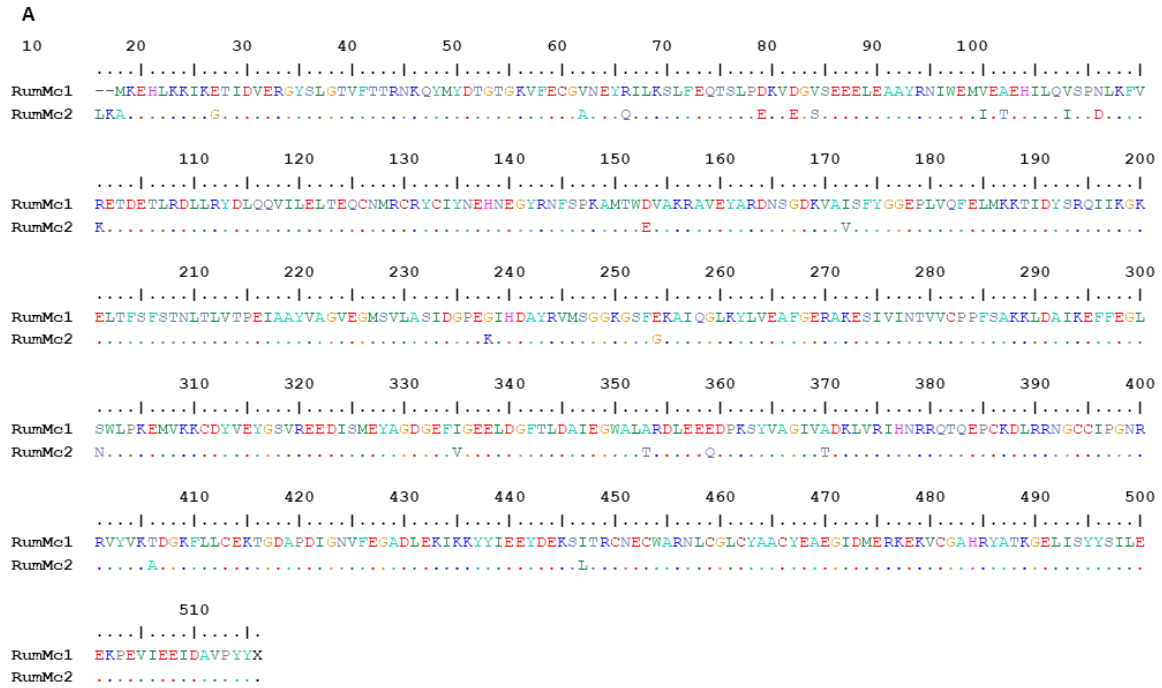
Fig. S10. Assessing RumC1 safety.

References (58, 59)

Other Supplementary Material for this manuscript includes the following:

(available at advances.sciencemag.org/cgi/content/full/5/9/eaaw9969/DC1)

Table S1 (Microsoft Excel format). Theoretical and experimental spectra lists.



B

Primer Name	Sequence (5'-3')	Target gene	Mutations	Application for
qPCR-rpoB-F	GGGGAAGAACTGGAGAACGTA	<i>rpoB</i>		RT-qPCR
qPCR-rpoB-R	TTCATATCAGGAGCGAAATC	<i>rpoB</i>		RT-qPCR
qPCR-C1-F	GGGATGTGTTTGTAGTGGAAAGC	<i>rumC1</i>		RT-qPCR
qPCR-C1-R	GCCGTTTTGCGACATTTGC	<i>rumC1</i>		RT-qPCR
qPCR-C2-F	GGTGGATGTAAATGCAGTGGC	<i>rumC2</i>		RT-qPCR
qPCR-C2-R	CACTCCGTTGTTCCACAGTAT	<i>rumC2</i>		RT-qPCR
qPCR-Mc1-F	AACTGGATGCGATCAAGGAG	<i>rumMc1</i>		RT-qPCR
qPCR-Mc1-R	AACGTGAAACCGTCCAGTTC	<i>rumMc1</i>		RT-qPCR
qPCR-Mc2-F	TGTTCTGGCAAGCATAGACG	<i>rumMc2</i>		RT-qPCR
qPCR-Mc2-R	CACTAAATGGCGGACAGACC	<i>rumMc2</i>		RT-qPCR
qPCR-Pc-F	GAGACCATCGGAGACGAGTG	<i>rumPc</i>		RT-qPCR
qPCR-Pc-R	TCACTGTCCGAATTTCTTTCC	<i>rumPc</i>		RT-qPCR
Mut-C1-C3A-F	CAAGTGGGGTGCCGTGTGCAGCG	<i>rumC1</i>	C3A	Site directed mutagenesis of mRumC1
Mut-C1-C3A-R	CTGCCCTCGAAGTCCGCA	<i>rumC1</i>	C3A	Site directed mutagenesis of mRumC1
Mut-C1-C5A-F	GGGTTGCGTGCCAGCGGTAGCA	<i>rumC1</i>	C5A	Site directed mutagenesis of mRumC1
Mut-C1-C5A-R	CACTTGCTGCCCTCGAAG	<i>rumC1</i>	C5A	Site directed mutagenesis of mRumC1
Mut-C1-C22A-F	TCCGGCGTACGCCGTGGTTATTG	<i>rumC1</i>	C22A	Site directed mutagenesis of mRumC1
Mut-C1-C22A-R	CCC CGTTATGGCTGTTT	<i>rumC1</i>	C22A	Site directed mutagenesis of mRumC1
Mut-C1-C26A-F	CGTGGGTTATGCCGCAACAACGGTGTGG	<i>rumC1</i>	C26A	Site directed mutagenesis of mRumC1
Mut-C1-C26A-R	CAGTACGCCGACCCGCG	<i>rumC1</i>	C26A	Site directed mutagenesis of mRumC1

Fig. S1. Multi-alignment of RumMc radical SAM enzymes. (A) Alignment of RumMc1 and RumMc2. Conserved residues are marked ".", small and small + hydrophobic (including aromatic -Y) residues are in red, acidic amino acids are in blue, basic amino acids in magenta, hydroxyl + sulfhydryl + amine + G amino acids are green and unusual amino/imino acids are in grey. Alignment of the five RumC peptide isoforms. **(B) Primers used in this study.** All primer sets used for RT-qPCR displayed good efficiency (between 87 and 100%).

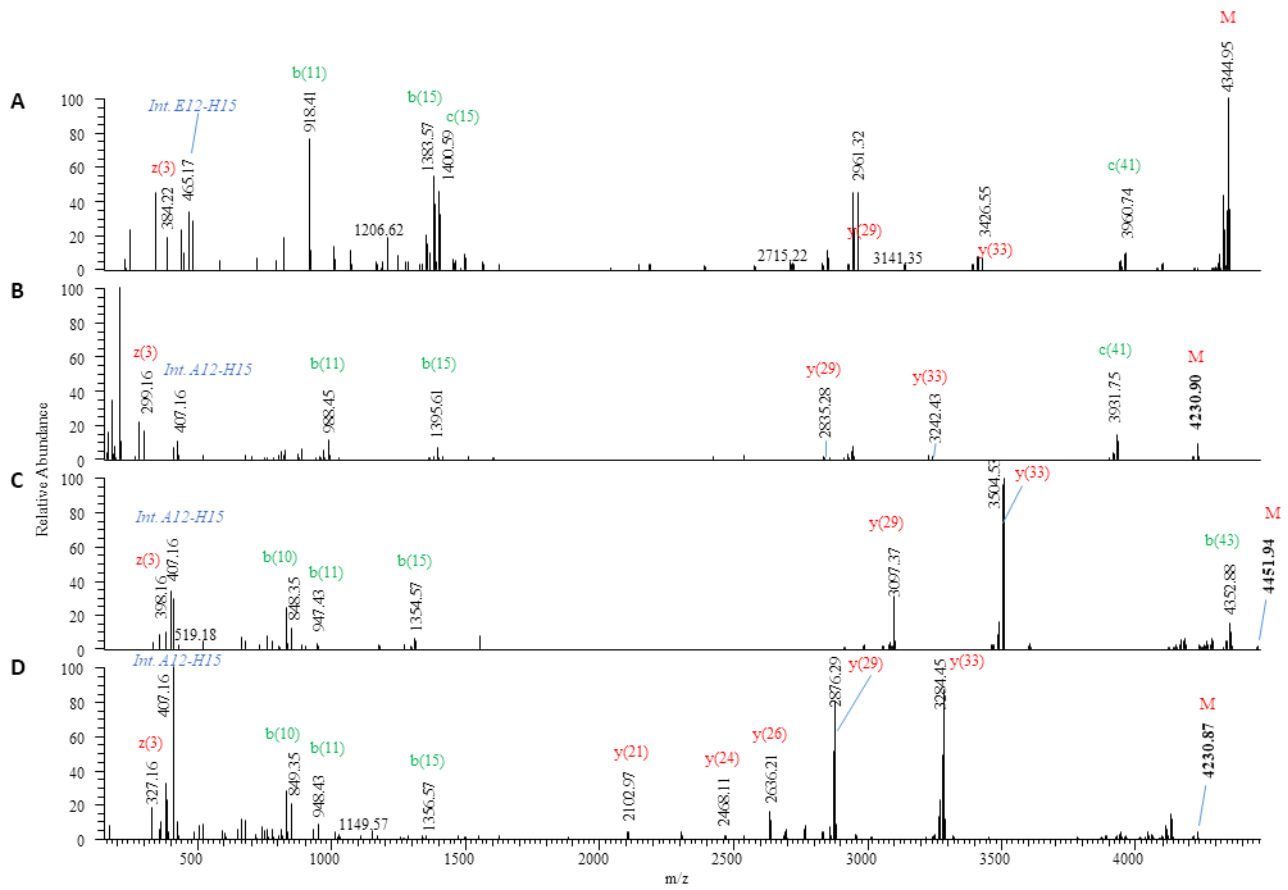


Fig. S2. Tandem mass spectra of RumC2-5 purified from cecal contents. Deconvoluted MS/MS spectra of (A) RumC2 peptide eluting at 18' with an $m/z = (1087.24)^{4+}$, (B) RumC3 peptide eluting at 22.5' with an $m/z = (1058.728)^{4+}$, (C) RumC4 peptide eluting at 20' with an $m/z = (1113.99)^{4+}$, and (D) RumC5 peptide eluting at 23' with an $m/z = (1058.722)^{4+}$. As observed for RumC1, these spectra reveal characteristic fragmentation patterns due to the presence of four thioether bonds in each mature peptide.

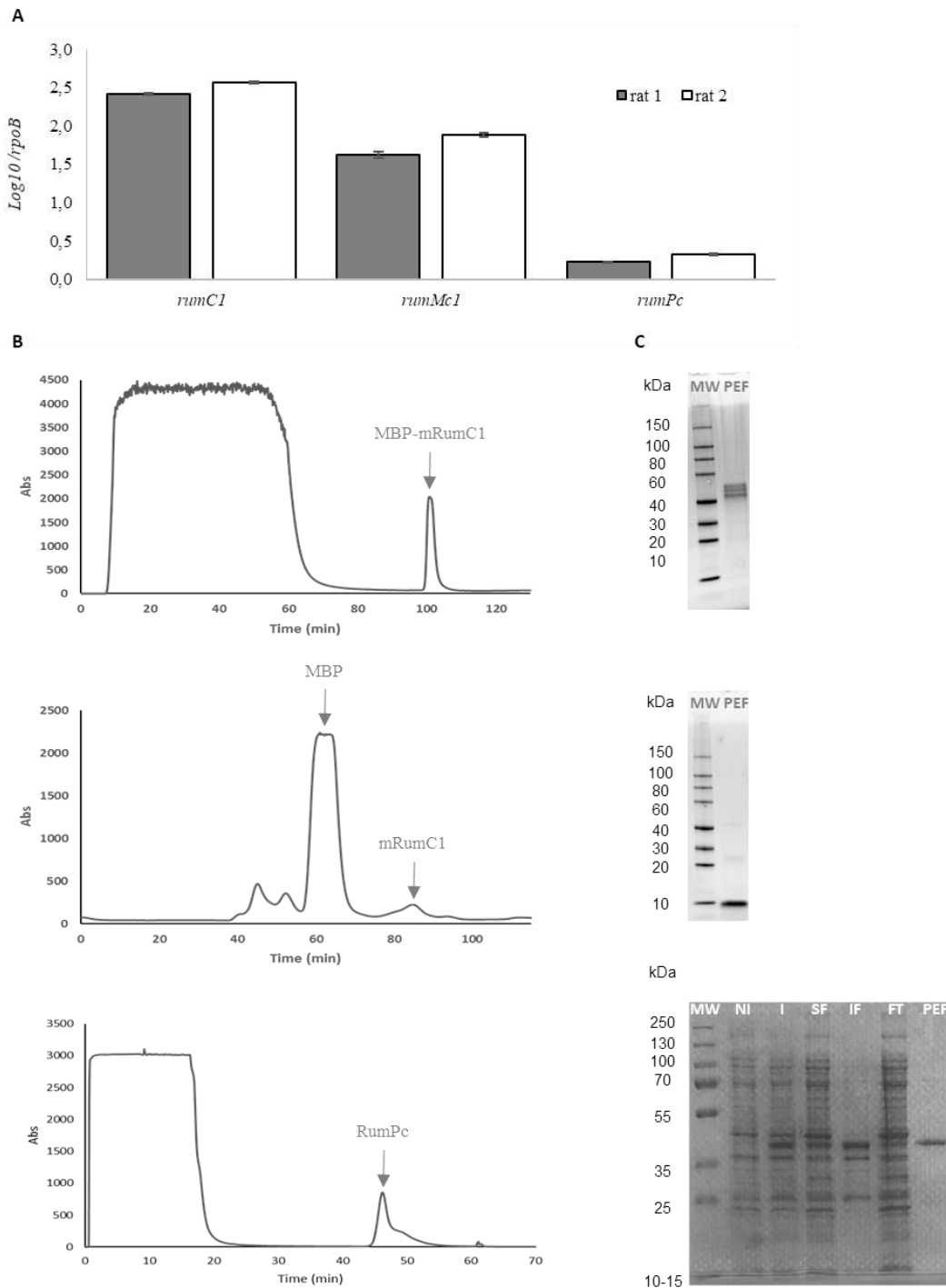


Fig. S3. Gene expression in the gut of rats monoassociated with *R. gnavus* E1 and heterologous expression and purification of MBP-mRumC1, mRumC1, and RumPc. (A) mRNA transcripts were purified from caecal contents of rats mono-associated with *R. gnavus* E1. Expression levels were measured for genes encoding the peptide RumC1, the sactisynthase RumMc1 and the peptidase RumPc. Expression levels for the genes of interest were normalised against expression of *rpoB*. **(B)** FPLC chromatograms of overexpressed MBP-mRumC1 (top), mRumC1 (middle) and RumPc (bottom). **(C)** SDS-PAGE analysis of purified MBP-mRumC1 (top), mRumC1 (middle) and RumPc (bottom). NI: Non-induced culture, I: Induced culture, SF: Soluble Fraction, IF: Insoluble Fraction, FT: FlowThrough and PEF: Pool of Eluted Fractions.

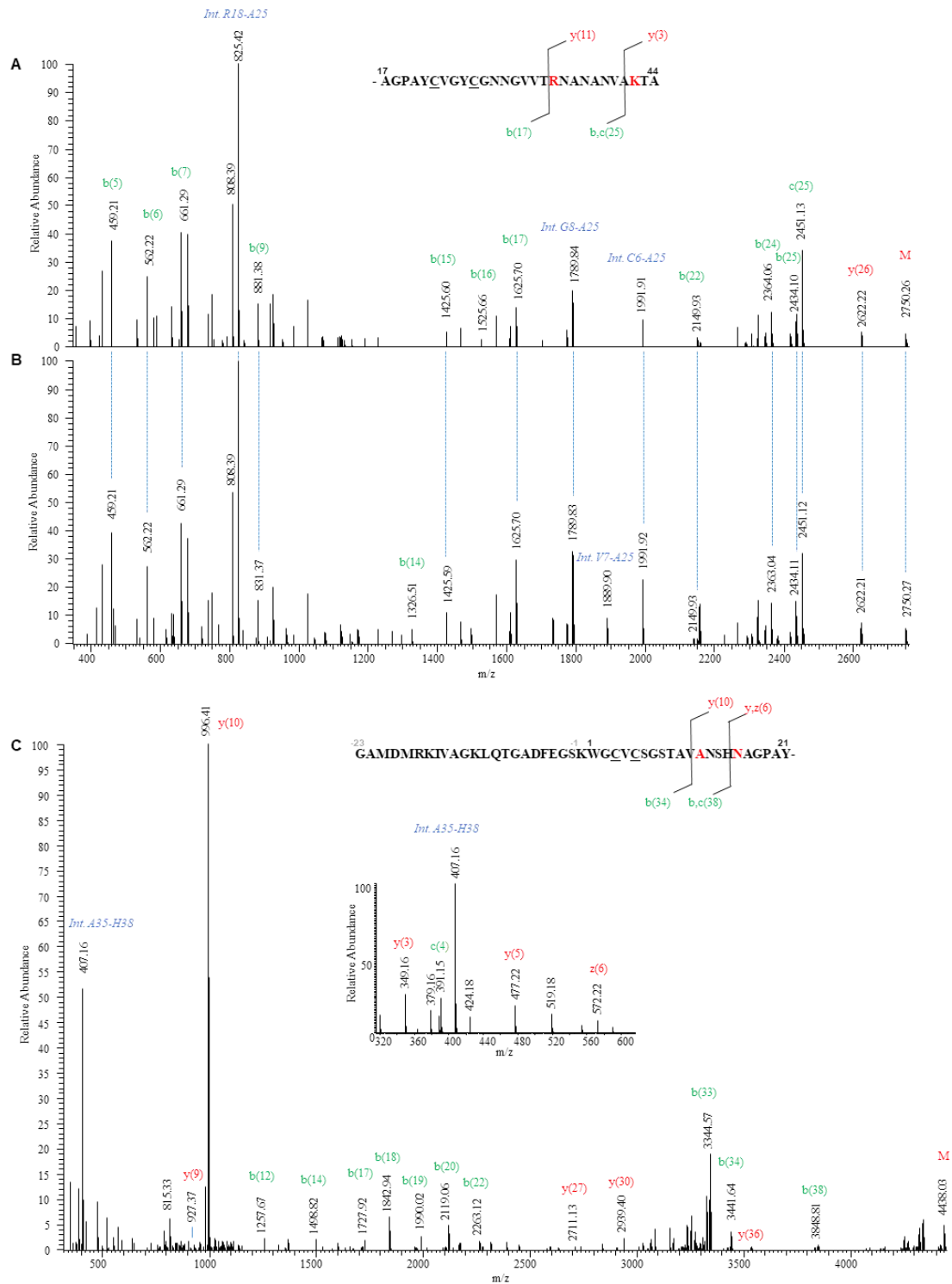


Fig. S4. Tandem mass spectra of N- and C-terminal fragments of RumC1 peptide present in in vivo and in vitro samples. (A) Deconvoluted MS/MS spectrum of a C-terminal fragment of the in vivo-produced RumC1 showing a 4-Da mass defect compared to the theoretical mass of the unmodified sequence and exhibiting intense internal fragments and high-intensity b/y fragments before bridged residues R34 and K42. **(B)** Deconvoluted MS/MS spectrum of the same fragment from mRumC1. **(C)** Deconvoluted MS/MS spectrum of an N-terminal fragment of mRumC1 with a 4-Da deficit and specific fragments due to thioether bridges. The inserted spectrum shows the low masses of the same MS/MS spectrum, demonstrating the involvement of A12 and N16 in thioether bridges.

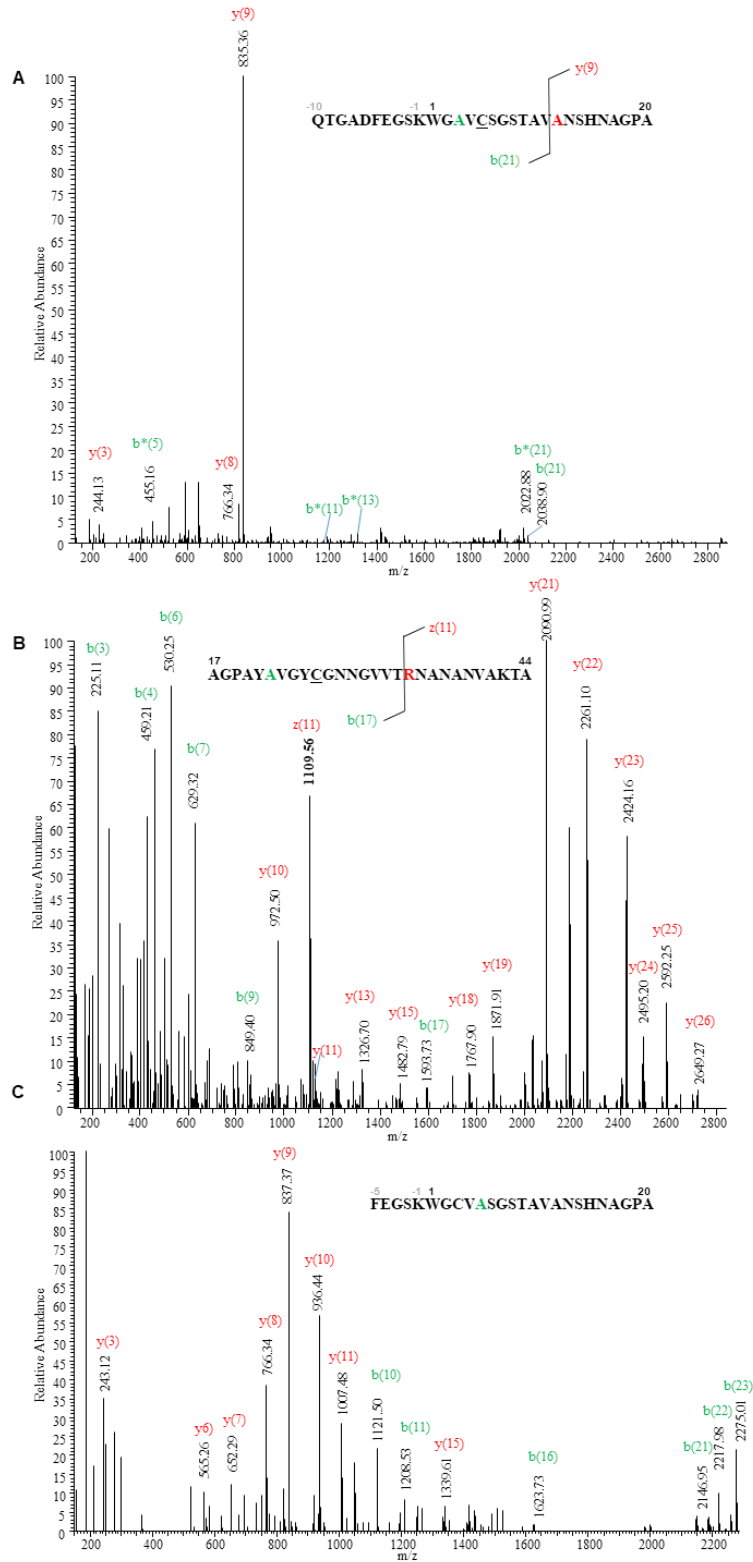


Fig. S5. Tandem mass spectra of mRumC1 mutants from which the residues involved in each thioether bridge were attributed. (see Table S1 for theoretical and observed masses of interest). **(A)** MS/MS spectrum of the Q(-10)-A20 fragment of mRumC1-C3A highlighting the presence of a unique thioether bridge between C5 and A12. The intense y9 fragment highlights the presence of a thioether bridge involving A12. **(B)** MS/MS spectrum of the A17-A44 fragment of mRumC1-C22A highlighting the presence of a unique thioether bridge between C26 and R34. **(C)** MS/MS spectrum of the F(-5)-A20 fragment of mRumC1-C5A revealing alkylation of C3. (b* corresponds to a b fragmentation with a loss of NH3 due to the presence of Q).

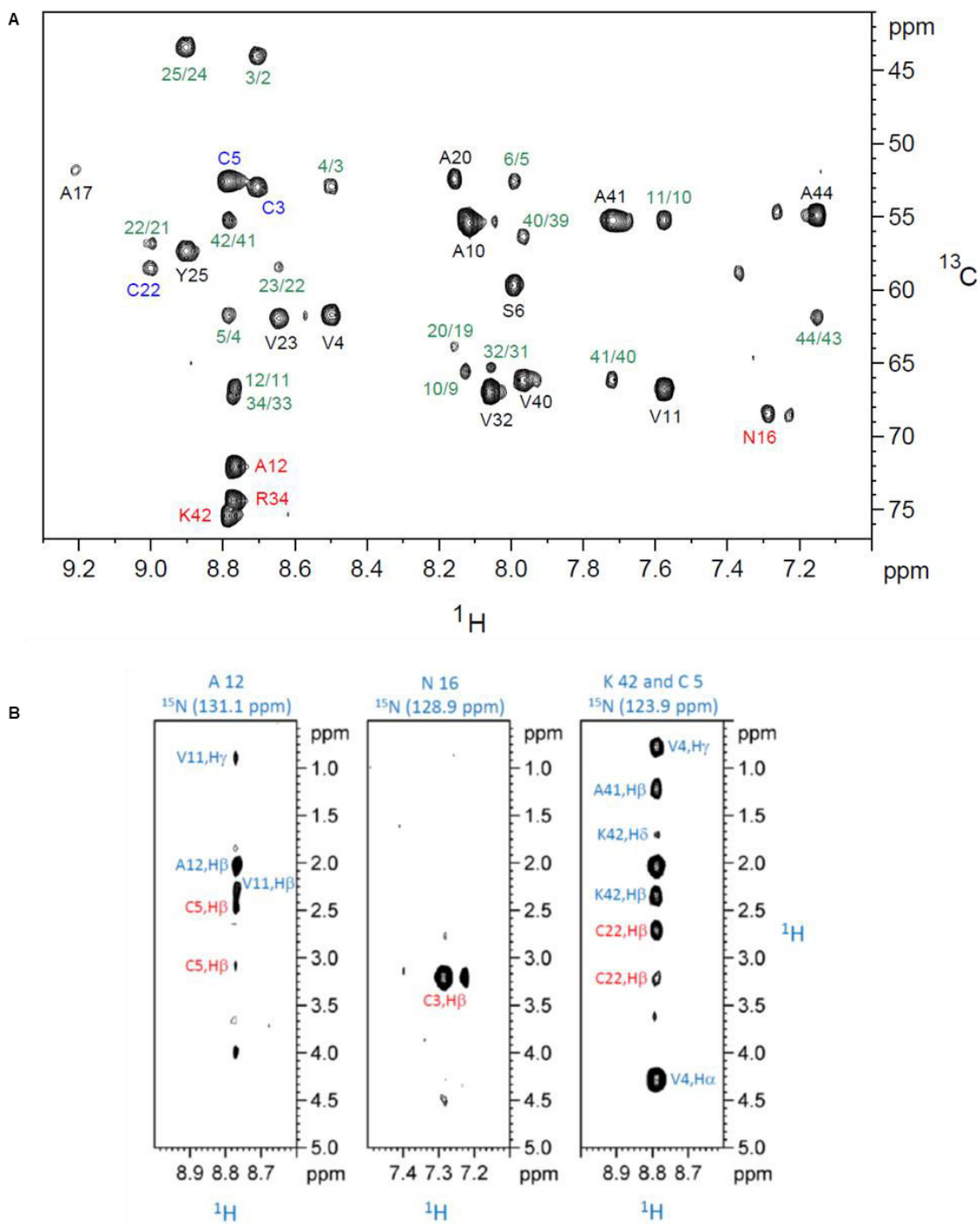


Fig. S6. Determination of the connectivity of the thioether linkages in RumC1 by NMR. (A) Superimposition of ^1H , ^{13}C planes of the HNCA spectrum showing the correlations between amide proton (HN_i) and α -carbons of its own residue ($\text{C}\alpha_i$) and that of the preceding residue ($\text{C}\alpha_{i-1}$). The sequential connectivities ($\text{HN}_i - \text{C}\alpha_{i-1}$) are indicated in green. Amino acids bridged via thioether bonds are shown in red and Cys partners are shown in blue. Note the large downfield shifts at 72.2, 68.6, 74.5 and 75.5 ppm for α -carbons of A12, N16, R34 and K42 residues, respectively. (B) Three ^1H - ^1H strip plots from a ^{15}N -NOESY-HSQC experiment taken at the amide ^{15}N and ^1H chemical shifts of A12, N16, K42 and C5. The backbone NH signals for K42 and C5 are overlapped. The structural connectivities between the β -protons of Cys and the amide protons of residues involved in a thioether bridge are in red (C5-A12, C3-N16 and C22-K42).

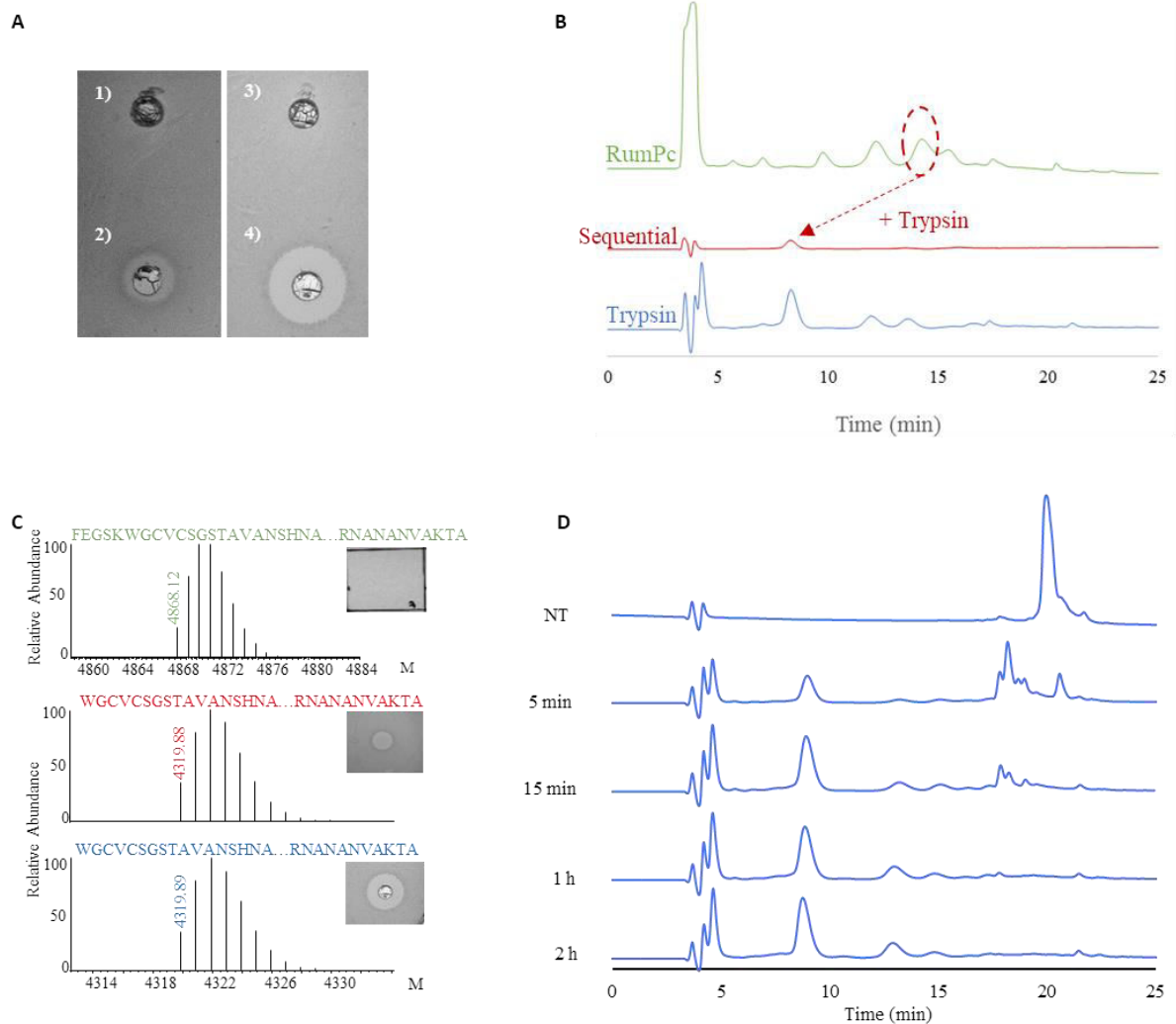


Fig. S7. Cleavage of the leader N-terminal peptides of mRumC1 and anti-Cp activity assays. (A) Anti-Cp activity assays with the different mRumC1 forms, 1: Inactive chemically synthesised unmodified RumC1, 2: Active filtered fraction from the ultrafiltration step used as positive control (see the *in vivo* purification protocol in Fig. 2), 3: Inactive mRumC1, 4: Active mRumC1cc (obtained after cleavage with trypsin). (B) RP-C₁₈ HPLC chromatograms of mRumC1 cleaved with RumPc, sequentially cleaved with RumPc and trypsin, or cleaved by trypsin only. (C) Observed masses of the different cleaved peptide forms and their corresponding anti-Cp activity assays (after RumPc cleavage (top), after RumPc followed by trypsin (middle) and after trypsin alone (bottom)). (D) RP-C₁₈ HPLC chromatograms of a kinetic study for the removal of the leader peptide of mRumC1 (see pic at 20 min) by trypsin leading to the mRumC1cc form (see pic at 9 min), duration of treatment with trypsin is indicated vertically, NT = no treatment. *Peptides were detected at 214 nm in HPLC output.*

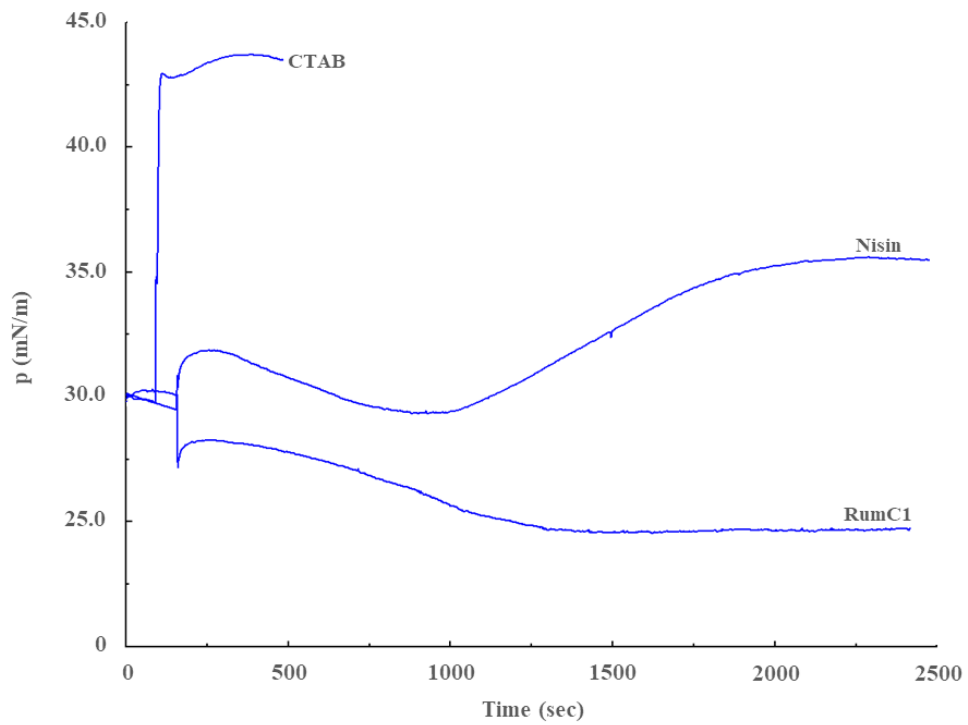
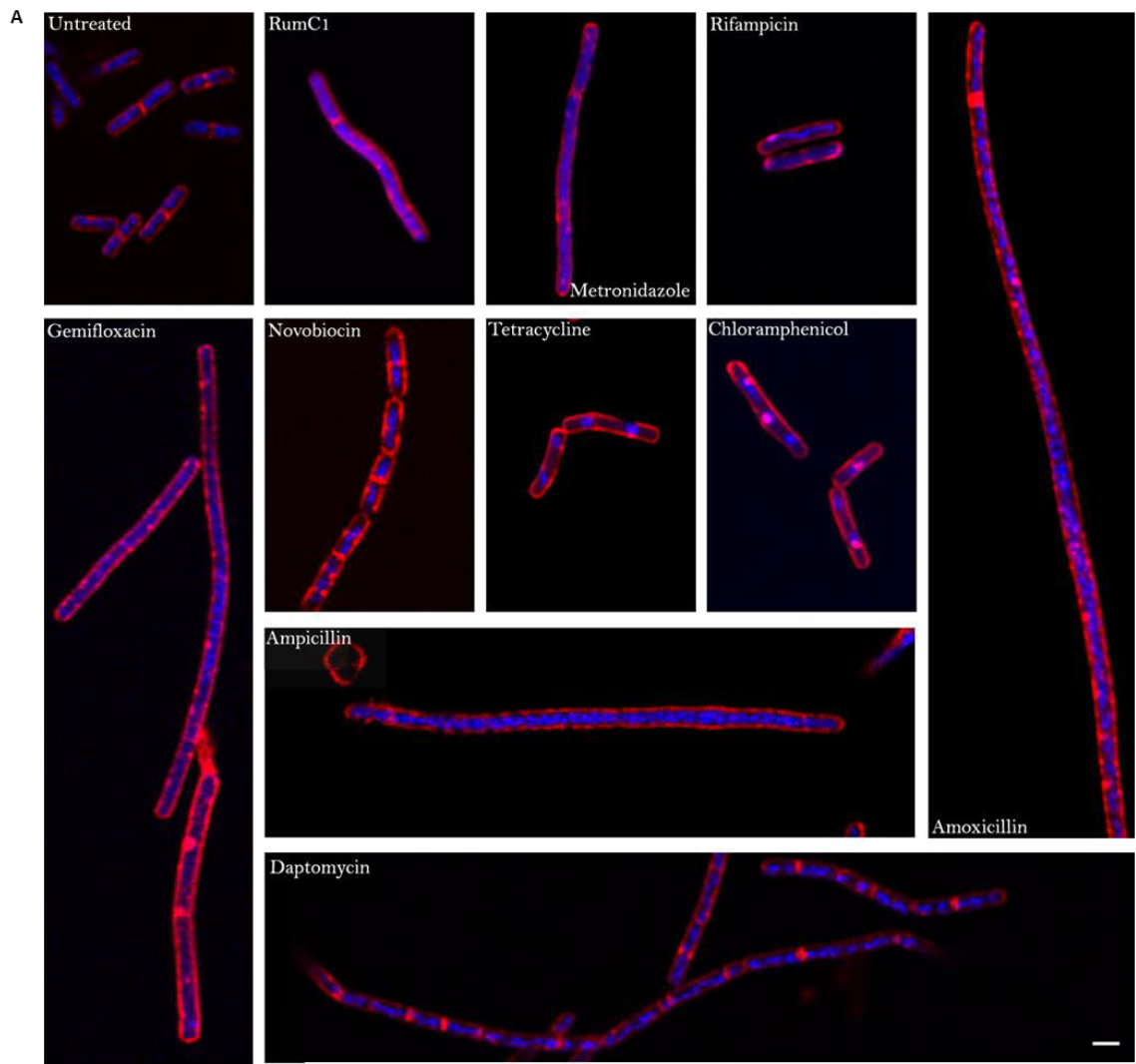


Fig. S8. Evaluation of the ability of RumC1 to insert into bacterial lipids. Total lipids from *C. perfringens* ATCC 13124 were extracted as described in the Supplementary Methods section. Total lipid extract was spread at the air-water interface until the surface pressure (p) reached approximately 30 mN/m. Tested molecules were then injected into the aqueous sub-phase and the insertion into lipids was followed through the continuous measurement of the surface pressure (p). The detergent cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) and the pore-forming antimicrobial peptide Nisin were used as positive controls. CTAB was used at 100 μ M whereas Nisin and RumC1 were assayed at 10 x MIC, *i.e.* 7.8 μ M and 15.6 μ M, respectively. Graph shown is representative of three independent experiments.



B

Mode of action	Antibiotics	Length	DNA (C/U)	Filament formation (Y/N)
Control		x 1	C	Not more than 2 cells
Inhibition cell wall synthesis	Amoxicillin	x 14-20	C	N
	Ampicillin	x 5-14	C	N
Inhibition DNA synthesis	Novobiocin	x 1	Hyper C	Y
	Gemifloxacin	x 2-9	U	Y and N
Inhibition RNA synthesis	Rifampicin	x 1-2	50 % hyper C / 50 % U	N
Inhibition protein synthesis	Tetracyclin	x 1-2	Hyper C, circular, 1-3	N
	Chloramphenicol	x 1-4	distinct molecules/cell	N
Loss membrane potential	Daptomycin	x 0.25-4	C	Y
Nucleic acid synthesis	Metronidazole	x 1-4	U with few C spots	Y
				- 2-4 short cells
				- 1 short + 1 long
				- 2 shorts + 1 long in the middle

Fig. S9. Bacterial cytological profiling against *Cp*. (A) Confocal imaging of untreated and antibiotic-treated *Cp* cells. Membranes were stained with FM4-64FX and DNA with DAPI. Scale bar = 2 μ m. (B) Description of the phenotypes observed in a. C=condensed, U=uncondensed, Y=yes, N=no. The Length corresponds to 'x times untreated cell-length'.

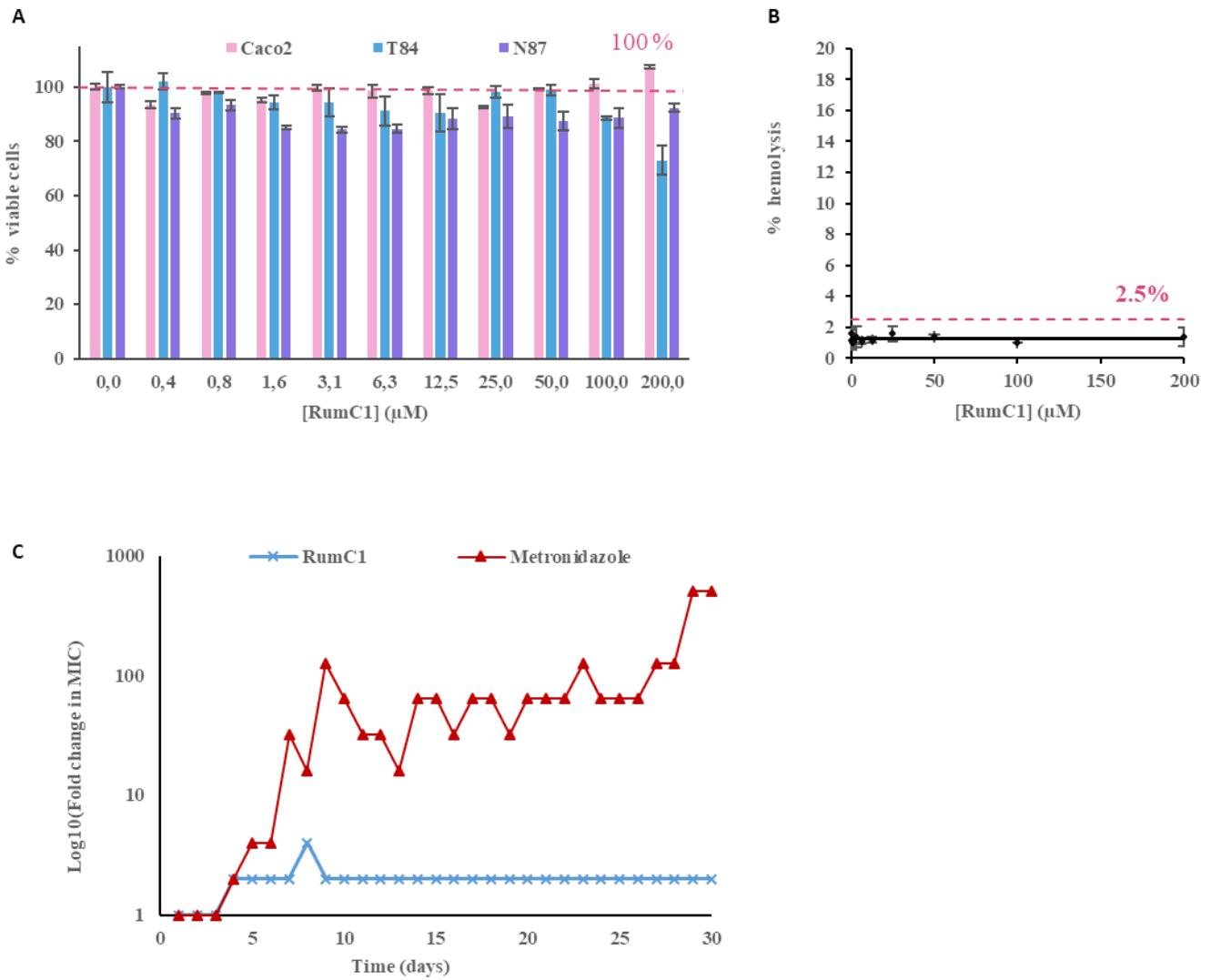


Fig. S10. Assessing RumC1 safety. Human intestinal cell lines (Caco2, T84) and gastric cell lines (N87) (A), and human erythrocytes (B) were incubated with increasing concentrations of RumC1. (A) Cells were incubated with resazurin and conversion into fluorescent resorufin was monitored to determine metabolic activity as an indicator of cell viability, untreated cells were used as a positive control. (B) Haemoglobin release was measured to monitor the lytic activity spectrum of RumC1. Cells incubated with CTAB were used as a positive control for maximum lysis, untreated cells were used as negative control. (C) Induction of resistance to *Cp*, assessed every day over 30 days treatment with RumC1 (blue) or metronidazole (red).

Supplementary Methods

RNA extractions and real-time PCR

RNA was extracted from the faeces of two *R. gnavus* E1 mono-associated rats collected before and after 12 days of colonization. Faecal samples were thawed in 1 mL RNAPro solution containing lysing matrix E (MP Biomedicals). The cells were homogenized in a Fast Prep FP120 cell homogenizer (Thermo Savant) for 2 cycles of 40 s at 6.0 m.s⁻¹. RNA was extracted from the aqueous phase by chloroform extraction and ethanol precipitation before being treated twice with DNase I (NEB). No bacterial RNA could be detected in the faeces of rats before colonization. cDNA was generated using the SuperScript VILO kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Real-time PCR amplification was performed using the LightCycler 480 Instrument and SYBR Green I Master (Roche) on 10 ng cDNA per reaction in the presence of 0.5 μM of each forward and reverse primers (Invitrogen) (fig. S1B). PCR amplification was initiated at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 10 s and 72 °C for 10 s. A melting curve was added at the end of the amplification to confirm primer specificity. All reactions were performed in duplicate and repeated five times. Fold change in *R. gnavus* E1 transcript amounts was determined using the 2-ΔCt method (58), using *rpoB* as the reference gene.

Peptide synthesis

The linear RumC1 peptide was prepared by solid phase peptide synthesis in an Initiator⁺ Alstra automated microwave assisted synthesizer (Biotage). The peptide was assembled on a Fmoc Ala Wang resin (0.125 mmol scale, 0.53 mmol/g) using standard Fmoc methodologies (59). After assembling, the peptide was manually deprotected and cleaved from the resin by treatment with the mixture TFA/TIS/water (%v/v = 95:2.5:2.5) for 2 h at room temperature and under nitrogen. The resin was filtered out and rinsed with TFA. The filtrate and rinses were combined and reduced under a nitrogen stream. Cold diethyl ether was added to precipitate the crude peptide, which was dissolved in the minimum amount of water and lyophilized. The crude peptide was purified by preparative reversed-phase HPLC in a Phenomenex Jupiter column (250 mm × 21.20 mm, 15 μm, 300 Å) using solvent A (99.9% water/0.1 % TFA) and solvent B (90% ACN/9.9% water/0.1 % TFA). The RumC1 peptide was eluted from the column with a linear gradient from 23.5% to 24.5% B at a flow rate of 10 mL/min. Its purity was checked by analytical reversed-phase HPLC (Phenomenex Jupiter column, 250 mm × 4.6 mm, 15 μm, 300 Å) and it was greater than 98%. The peptide was characterized by Electrospray Ionization-Mass spectrometry (ESI-MS) in positive mode using

an online nano-LC–MS/MS (NCS HPLC, Dionex, and Qexactive HF, Thermo Fisher Scientific).

Site directed mutagenesis of mRumC1

Site directed mutagenesis of the *MBP-RumC1* construct was performed following instructions from the Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit (New England BioLabs®). The NEBaseChanger tool was used to generate primer sequences (fig. S1B) and annealing temperatures for each Cys to Ala single mutant. Template plasmids were digested using *DpnI* and were transformed into competent Top10 cells. The mutant plasmids were recovered from cells by using the Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega).

Cysteine Alkylation

Ammonium bicarbonate was added to a solution of MBP-mRumC1 (or MBP-mRumC1 mutants) at a concentration of 100 mM. Dithiothreitol was added to this solution at a concentration of 5 mM and subsequently incubated at 55 °C for 35 min. Iodoacetamide was added at a final concentration of 14 mM to alkylate free cysteine and the solution was further incubated at room temperature for 30 min in the dark. To quench unreacted iodoacetamide, dithiothreitol was added to this solution at a concentration of 5 mM and incubating at room temperature for 15 min in the dark. The solution was collected and analysed by LC-MS.

Isotopic labeling of mRumC1

A synthetic plasmid containing the *E. coli* codon-optimized gene of *R. gnavus* E1 encoding RumMc1 (pET-15b-*rumMc1*, ampicillin-resistant) was obtained from Genscript. Plasmids pET-15b-*rumMc1*, pETM-40-*rumC1* and psuf (chloramphenicol-resistant) containing *sufABCDSE* genes were used to transform competent *E. coli* BL21 (DE3) cells. The resulting strain was grown in 3 L of M9 medium containing kan (50 µg/mL), amp (100 µg/mL), chl (34 µg/mL), vitamin B1 (0.5 µg/mL), MgSO₄ (1 mM), FeCl₃ (50 µM) and glucose (4 mg/mL) at 37 °C. At an optical density (OD₆₀₀) of 0.25, cells were harvested by centrifugation (4,000 rpm for 20 min at 4°C). The cells were resuspended in 1 L of labeled minimal medium (Na₂HPO₄ 6 g/L, KH₂PO₄ 3 g/L, ¹⁵NH₄Cl 1 g/L) containing kan (50 µg/mL), amp (100 µg/mL), chl (34 µg/mL), vitamin B1 (0.5 µg/mL), MgSO₄ (1 mM), FeCl₃ (50 µM) and labeled glucose-¹³C (4 mg/mL). The culture was grown at 25°C to an optical density (OD₆₀₀) of 0.8. FeCl₃ (100 µM) and L-cysteine (300 µM) were then added and the culture was induced with 1 mM IPTG. The cells were grown for 15h under stirring and then were harvested by centrifugation (4,000 rpm for 20 min at 4°C). Labeled mRumC1 was purified as described for the unlabeled sample.

NMR of RumC1

NMR experiments were conducted at 27°C, by using a ^{15}N , ^{13}C -labeled RumC1 sample of 0.2 mM in 10 mM phosphate buffer, pH 6.8, in H₂O. NMR data were acquired using a Bruker Avance III 600 MHz spectrometer equipped with a cryogenically cooled triple resonance ($^1\text{H}/^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$) 5 mm probe. The following datasets were performed; 2D: [^{15}N , ^1H] HSQC and [^{13}C , ^1H] HSQC; 3D: [^1H , ^{15}N , ^{13}C] HNCACB, CBCA(CO)NH, HNCA, HN(CO)CA, HNCO, HN(CA)CO, ^{15}N -NOESY-HSQC (mixing time of 150 ms) and ^{13}C -TOCSY-HSQC (spin lock of 80 ms).

Lipid insertion assay

Lipid insertion was measured using reconstituted lipid monolayer at the air-water interface as previously described (54, 58). Total lipids were extracted from 3 mL of an overnight culture of *C. perfringens* ATCC 13124 as previously described (58). Extracted total lipids were dried, resolubilized in chloroform:methanol (2:1, v:v) and store at -20 °C under nitrogen. For lipid insertion assay, total lipid extract was spread using a 50 μL Hamilton's syringe at the surface of 700 μL of sterile PBS creating a lipid monolayer at the air-water interface. Lipids were added until the surface pressure reached approximatively 30 mN/m, this surface pressure corresponding to a lipid packing density theoretically equivalent to that of the outer leaflet of the cell membrane (54). Lipid insertion of tested molecules was evaluated by injecting them directly into the 700 μL sub-phase of PBS under the lipid monolayer (pH 7.4, volume 800 μL) using a 10 μL Hamilton syringe. Tested molecules were: i) the detergent Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) (at a final concentration of 100 μM), ii) the pore-forming antimicrobial peptide Nisin (at a final concentration of 7.8 μM , corresponding to 10-times its MIC) and iii) RumC1 (at a final concentration of 15.6 μM , corresponding to 10-times its MIC). The variation of the surface pressure caused by the insertion of the molecules into the lipid monolayer was then continuously monitored using a fully automated microtensiometer ($\mu\text{TROUGH SX}$, Kibron Inc., Helsinki, Finland) until reaching equilibrium.

Résumé

Les antibiotiques sont des médicaments qui ont changé notre manière d'aborder les infections bactériennes et sont devenus l'un des symboles de la médecine moderne. Cependant leur utilisation massive a conduit à l'émergence de souches bactériennes multirésistantes. Ce problème est sans aucun doute un des grands défis que la médecine actuelle doit relever. Sachant que les bactéries évoluent à un rythme plus rapide que la production de nouveaux antibiotiques, il est urgent de trouver des approches alternatives. Il a été mis en évidence que ces mêmes bactéries sont capables de sécréter différents peptides antimicrobiens, ou bactériocines. Ces macromolécules présentent une grande diversité structurale et sont très efficaces pour combattre un grand nombre de souches pathogènes de façon spécifique. Les bactériocines ont un immense potentiel dans les domaines agroalimentaire et pharmaceutique. Notre projet s'intéresse aux bactériocines RumCs produites par une souche dérivée de *Ruminococcus gnavus*, une bactérie anaérobie stricte, membre dominant du microbiote intestinal humain. Le travail présenté dans ce manuscrit concerne la mise au point d'un système d'expression et de maturation hétérologue chez *E. coli* de la bactériocine RumC1. La caractérisation biochimique du peptide RumC1 montre que les bactériocines RumCs appartiennent à la famille des sactipeptides pour laquelle l'étape de biosynthèse fait intervenir une enzyme radical-SAM. Les sactipeptides présentent dans leurs séquences peptidiques un ou plusieurs ponts thioéther entre une cystéine et le carbone alpha d'un acide aminé partenaire. RumC1 renferme 4 ponts thioéther ce qui lui confère une structure originale en double épingle à cheveux. L'activité biologique de RumC1 montre que ce peptide est efficace contre un large spectre de bactéries à Gram positif incluant des pathogènes résistants tels que *S.aureus* et *E. faecalis*. Dans ces études nous n'avons pas noté de toxicité significative de RumC1 sur différentes lignées cellulaires humaines ni observé de phénomène de résistance. Les travaux en cours visent notamment à définir le mode d'action de RumC1 et à évaluer l'activité biologique de RumC1 dans un contexte d'infection *in vivo* chez la souris.

Mots clés : peptide antimicrobien, *Ruminococcus gnavus* E1, RiPPs, enzyme radical-SAM, sactipeptide, bactériocine RumC

Abstract

Antibiotics are drugs that have changed the way we approach bacterial infections and have become one of the symbols of modern medicine. However, their widespread use has led to the emergence of multiresistant bacterial strains. This problem is undoubtedly one of the major challenges facing today's medicine. Knowing that bacteria evolve at a faster rate than the discovery of new antibiotics, it is urgent to find alternative approaches. It has been shown that these same bacteria are capable of secreting antimicrobial peptides, the bacteriocins. These macromolecules have a high structural diversity and are very effective in combating a large number of pathogenic strains in a specific way. Bacteriocins have immense potential in the agro-food and pharmaceutical sectors. Our project focuses on the bacteriocins RumCs produced by a strain derived from *Ruminococcus gnavus*, a strict anaerobic bacterium of the human intestinal microbiota. The work presented in this manuscript concerns the development of a heterologous expression and maturation system in *E. coli* of the bacteriocin RumC1. The biochemical characterization of the RumC1 peptide shows that the RumCs bacteriocins belong to the family of sactipeptides for which the biosynthesis step involves a radical-SAM enzyme. The sactipeptides have in their peptide sequences one or more thioether bridges between a cysteine and the alpha carbon of a partner amino acid. RumC1 contains 4 thioether bridges which gives it an original structure in double hairpin. The biological activity of RumC1 shows that this peptide is effective against a broad spectrum of Gram-positive bacteria including resistant pathogens such as *S.aureus* and *E. faecalis*. In these studies, we did not note any significant toxicity of RumC1 on different human cell lines nor observed resistance phenomena. Current work aims to define the mode of action of RumC1 and to evaluate the biological activity of RumC1 in an *in vivo* context of infection in mice.

Key Words: antimicrobial peptide, *Ruminococcus gnavus* E1, RiPPs, radical-SAM enzyme, sactipeptide, RumC bacteriocin