



HAL
open science

Exploration expérimentale du métabolisme du soufre dans le vivant

Thomas Bessonnet

► **To cite this version:**

Thomas Bessonnet. Exploration expérimentale du métabolisme du soufre dans le vivant. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLE035 . tel-03329174

HAL Id: tel-03329174

<https://theses.hal.science/tel-03329174>

Submitted on 30 Aug 2021

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.

Exploration expérimentale du métabolisme du soufre dans le vivant

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée au Genoscope/UMR8030 (CEA)
et à l'Université d'Evry Val d'Essonne

École doctorale n°577
Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée et soutenue à Evry, le 15 octobre 2018, par

Thomas Bessonnet

Composition du Jury :

Jacques Oberto Directeur de recherche, CEA/CNRS/Université Paris Saclay (UMR9198, I2BC)	Président
Sandrine Boschi-Muller Professeur, CNRS/Université de Lorraine (UMR7365, IMoPA)	Rapporteure
Isabelle Martin-Verstraete Professeur, Pasteur/Université Paris Diderot (Laboratoire de pathogenèse des bactéries anaérobies)	Rapporteure
Antoine Danchin Professeur, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière (Institute of Cardiometabolism and Nutrition)	Examineur
Georges Fremy Expert chimiste, Arkema	Examineur
Véronique de Berardinis Directrice de recherche, Genoscope/CEA (UMR8030 génomique métabolique)	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Marcel Salanoubat pour m'avoir accueilli au sein de l'UMR8030 de Génomique Métabolique du Genoscope, ainsi que Véronique de Bérardinis qui m'a fait confiance dès mon arrivée et conseillé tout au long de ma thèse. Son optimisme, ses conseils et sa détermination m'ont été d'un grand soutien tout au long de ce parcours de titan. Je remercie également les membres de mon jury de thèse, Mme Isabelle Martin-Verstraete et Mme Sandrine Boschi-Muller, rapporteurs du jury, ainsi que M. Jacques Oberto, M. Antoine Danchin et M. Georges Fremy, examinateurs, pour avoir accepté de lire et discuter de mes travaux de recherche.

Merci à Alain Perret, pour sa co-supervision et son expertise de biochimiste qui m'ont été d'un grand secours, tout comme Karine Bastard et ses explications toujours claires et posées qui m'ont rendu la bioinformatique indispensable un peu moins obscure.

Je remercie également tous les membres de l'équipe LCAB : Jean-Louis Petit, toujours à l'écoute et de bon conseil ; Marielle Besnard-Gonnet, sans qui j'aurais passé beaucoup plus de temps sur certaines expériences et avec qui j'ai pris plaisir à travailler ; Adrien Debard et Virginie Pellouin, qui m'ont accueilli aussi bien en stage qu'en doctorat et répondu à mes nombreuses questions pratiques. Merci également à Aline Mariage, qui malgré les absences forcées a été déterminante dans ce projet, et qui m'a initié à un grand nombre de techniques et de méthodes nécessaires pour le mener à bien. Tous ont sû me guider aussi bien dans la démarche scientifique expérimentale qu'intellectuelle.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble de l'équipe LGBM : Christine Pellé et Peggy Sirvain de la plateforme FPLC, Emilie Pateau, Christophe Lechaplais et Ekaterina Darii pour la spectrométrie de masse, Nadia Perchat-Demange et Pascal Bazire pour la métabolomique. Je vous suis reconnaissant pour toute l'aide que chacun et chacune d'entre vous m'avez apportée.

J'aimerais également remercier l'équipe LCOB et plus particulièrement Carine Vaxelaire-Vergne, chercheur-ingénieur, et Aurélie Fossey qui m'a redonné goût à l'HPLC.

Merci également aux personnes de l'équipe séquençage et à celles de l'équipe LABGeM qui m'ont aidé et accompagné dans mes démarches, aux équipes LA et LMP, ainsi qu'à tous mes autres collègues : Sébastien Chaussonnerie, Magali Boutard, Ivan Dubois, Agnès Barbance, Nathalie Vega, Anne Berger, Valérie Delmas, ainsi qu'à tous ceux que j'omets malgré moi mais avec qui j'ai passé de bons moments, pour votre enthousiasme et votre disponibilité. Vous n'avez jamais hésité à prendre un peu de votre temps pour me venir en aide sur des problèmes aussi divers qu'impromptus.

J'aimerais évidemment aussi remercier aussi bien les doctorants chimistes, Marion Chevallier, Marion Thomas, Ombeline Mayol, Oriane Della-Negra, Chloé Lelièvre, que les doctorants biologistes, Sophia Belkhelfa, Tiffany Souterre, Tristan Cerisy et le docteur WR. Un jour ces deux mondes se parleront. Je n'exprimerai pas tout le bonheur que j'ai eu à réaliser ma thèse à vos côtés car ces remerciements doivent tenir sur une page.

Enfin je remercie mes parents et plus généralement ma famille, ainsi que mes amis, pour leur soutien sans faille au cours de ces trois années.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	9
LISTE DES FIGURES.....	11
LISTE DES TABLEAUX.....	17
LISTE DES ANNEXES	19
I INTRODUCTION	21
1.1 Voies de biosynthèse de la L-cystéine	22
1.1.1 Sulfhydrylation	22
1.1.1.1 Activation de la L-sérine.....	22
1.1.1.2 Cystéine synthases et régulation de la biosynthèse de la L-cystéine	25
1.1.2 Biosynthèse ARNt-dépendante de la cystéine, voie alternative.....	31
1.2 Voies de biosynthèse de la méthionine.....	32
1.2.1 Acylation de la L-homoserine	35
1.2.2 Biosynthèse de la L-homocystéine et voies d'incorporation du soufre	41
1.2.2.1 Voie de transsulfuration.....	43
1.2.2.2 Voie de sulfhydrylation directe	47
1.2.2.3 Problèmes d'annotation des enzymes de ces voies	54
1.2.3 Synthèse de la méthionine depuis l'homocystéine	63
1.3 Utilisation de la méthionine dans le métabolisme synthétique	65
1.3.1 Le cycle du méthyle activé (AMC) et ses dérivés	65
1.3.1.1 Cycle de la S-adenosylméthionine (SAM) ou cycle AdoMet.....	65
1.3.1.2 AdoMet (SAM) et le cycle de Yang : biosynthèse du 5'-Méthylthioadénosine (MTA), de polyamines et de méthionine	69
1.3.2 Voies de recyclage de la L-méthionine et de la L-cystéine	83
1.3.2.1 Catabolisme de la L-cystéine en H ₂ S	84
1.3.2.2 Voie de transsulfuration réverse et cystéine	86
1.3.2.3 Les voies de déméthylation/déméthiolation et méthanethiol.....	93
1.3.2.3.1 Etape 1 : synthèse du méthanethiol.....	94
1.3.2.3.2 Etape 2 : du méthanethiol au DMS	100
1.3.2.4 Catabolisme du DMS : vers la production de sulfites et d'H ₂ S	102
1.3.2.5 Synthèse du DMSP à partir de la L-méthionine et catabolisme	106
1.4 A. baylyi ADP1, bactérie modèle	116
1.4.1 Des ressources génomiques et des outils pour l'étude du métabolisme d'ADP1.....	117
1.4.2 Biosynthèse de la méthionine chez ADP1.....	118
1.4.3 Biosynthèse de la L-cystéine.....	123
1.4.4 Sources alternatives du sulfate.....	124

II MATERIEL ET METHODES	126
2.1 Projet ADP1.....	126
2.1.1 Surexpression et purification des enzymes solubles de l'ORFéome	126
2.1.1.1 Transformation bactérienne	126
2.1.1.2 Induction à l'IPTG	126
2.1.1.3 Lyse cellulaire et dosage des protéines extraites	127
2.1.1.4 Purification His-Tag - chromatographie d'affinité.....	128
2.1.2 Construction du mutant de délétion $\Delta cys1$ essentiel sur sulfate	129
2.1.3 Phénotypage de la banque de mutants.....	130
2.1.3.1 Phénotypage complet en plaque 96 puits.....	130
2.1.3.2 Phénotypage en plaque Bioscreen.....	130
2.1.3.3 Synthèse du MTR à partir du MTA	131
2.1.4 Analyses spectrophotométriques.....	131
2.1.4.1 Détection de l'ammoniaque : test couplé à la glutamate déshydrogénase (GDH)	131
2.1.4.2 Test couplé à la GDH et détection de l'activité Met-TAM.....	131
2.1.4.3 Détection du pyruvate : test couplé à la lactate déshydrogénase (LDH)	132
2.1.5 Détection de l'activité cystathionine- β -synthase par LC-MS	132
2.1.6 Transcriptomique	133
2.1.6.1 Extraction des ARNs au TRIZOL MAX	133
2.1.6.2 Traitement à la DNase TURBO	133
2.1.6.3 Purification et fractionnement des ARNs.....	134
2.2 Projet SAT/SST.....	134
2.2.1 Clonage et surexpression des SST.....	135
2.2.2 Activités O-acyl-CoA transférases	137
2.2.3 Synthèse chimique de l'O-succinyl-L-sérine (OSS).....	137
2.2.4 Activité cystéine synthase	138
2.2.5 Détection de l'O-succinyl-L-sérine	138
2.2.5.1 Préparation du Métabolome.....	138
2.2.5.2 Analyse du métabolome	139
2.2.6 Construction des mutants des MetX de <i>X. campestris</i> en vue d'invertir les activités HST et SST	140
III RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	142
3.1 Projet SST.....	142
3.1.1 Description détaillée du groupe ASMC MetX-G3	142
3.1.2 Les MetX-HST2 fongiques (Cys2) sont-elles des SAT ou SST ?	144
3.1.3 L'acylation de la L-sérine est-elle répandue dans les familles MetX et MetA ?.....	146
3.1.4 Caractérisation de la L-sérine O-succinyltransférase de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> et de son produit enzymatique	149
3.1.4.1 Synthèse chimique du standard O-succinyl-L-sérine (OSS)	149
3.1.4.2 Validation in vitro de la formation du nouveau métabolite OSS.....	150
3.1.4.3 Paramètres cinétiques de Cys2 de <i>S. pombe</i>	154
3.1.4.4 L'OSS, un métabolite inédit impliqué dans la biosynthèse de la L-cystéine : validation in vivo chez <i>S. pombe</i>	154
3.1.5 Analyse structurale des sites actifs des STT versus MetX-HST.....	157
3.1.6 Des L-sérine O-succinyltransférases chez les procaryotes ?	159
3.1.6.1 Validation in vitro de l'activité SST de diverses Xanthomonadales	161
3.1.6.2 Validation in vitro de la formation d'OSS.....	162
3.1.6.3 Paramètres cinétiques de MetX-HST2 de deux Xanthomonadales : <i>Xanthomonas campestris</i> et <i>Frateuria aurantia</i>	163
3.1.6.4 Validation in vivo de la biosynthèse d'OSS chez <i>X. campestris</i>	165

3.1.7	SST et HST, deux activités intervertibles ?	167
3.1.7.1	Sélection des mutations en P9 du logo et constuction des mutants MetX HST et SST de <i>X. campestris</i>	167
3.1.7.2	Caractérisation biochimiques des mutants MetX de <i>X. campestris</i>	168
3.1.8	Utilisation de l'OSS par les cystéine synthases	170
3.1.8.1	Paramètres cinétiques de la cystéine synthase Cys1a de <i>S. pombe</i>	171
3.1.8.2	Paramètres cinétiques des cystéine synthases de <i>X. campestris</i> et <i>F. aurantia</i>	173
3.1.8.3	Les SST forment elles un complexe avec la cystéine synthase ?	176
3.1.8.4	Capacité des cystéine synthases CysM et Cys1b à utiliser l'OSS	178
3.1.8.5	Comparaison avec CysK d' <i>A. baylyi</i> ADP1	179
3.1.9	SST impliquées dans la voie de biosynthèse de la D-cyclosérine.....	183
3.1.9.1	DcsE chez <i>Streptomyces lavendulae</i>	183
3.1.9.2	Biosynthèse de la cyclosérine chez des γ et α -protéobactéries.....	185
3.1.10	L'activité SST et le reste du vivant	187
3.2	Projet ADP1.....	192
3.2.1	Recherche des enzymes impliquées dans la transsulfuration réverse	192
3.2.1.1	Identification des enzymes à PLP d'ADP1	192
3.2.1.2	Tests d'activité CTT β -synthase (CBS).....	195
3.2.1.3	Tests d'activité CTT γ -lyase (CGL)	199
3.2.2	Recherche des enzymes impliquées dans la voie de recyclage par phénotypage de la collection de mutants... ..	201
3.2.3	Construction du mutant Δ CysI et vérification de l'hypothèse : la voie de recyclage de la L-méthionine passe par la production de H ₂ S.....	206
3.2.3.1	Construction du mutant Δ cysI (Δ ACIAD2982)	207
3.2.3.2	Phénotypage du mutant Δ cysI	208
3.2.4	Recyclage de la méthionine via le méthanesulfonate chez ADP1	211
3.2.4.1	Phénotypage des mutants Δ cysM, Δ cysI, Δ ssuD	211
3.2.4.2	Conversion de la L-méthionine en méthaneethiol	213
3.2.5	Etude du métabolisme de la méthionine chez ADP1 par une approche transcriptomique.....	219
3.2.5.1	Obtention des données de transcriptomique avec sulfate versus méthionine ou cystéine comme source de soufre.....	220
3.2.5.2	Expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la L-méthionine.....	222
3.2.5.3	Protéines SSI d'ADP1	224
3.2.5.4	Recherche d'un régulateur similaire à CysB.....	228
3.2.5.5	Corrélation entre source de soufre et métabolisme du fer chez ADP1.....	232
3.2.6	Recyclage de la L-méthionine via le DMSO puis le méthanesulfonate ?	234
3.2.6.1	Du Méthaneethiol au DMS chez ADP1.....	240
3.2.6.2	Du DMSP au DMS	242
3.2.7	ADP1 et la diversité des sources de S assimilables	244
IV	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	249
BIBLIOGRAPHIE	253	
ANNEXES.....	285	
PUBLICATION	303	

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP1	Acinetobacter baylyi ADP1
ARN	Acide Ribonucléique
ASMC	Active Sites Modeling and Clustering
BET	Bromure d'Ethidium
BSA	Bovine Serum Albumin
Boc	tButyloxy carbamate
C-ter	C-terminale
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CCD	Charge-Coupled Device
ddNTP	Didésoxyribonucléotide Triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine Triphosphate
dNTP	Désoxynucléotide Triphosphate
DO	Densité Optique
DTT	Dithiothréitol
E. coli	Escherichia coli
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GC	Guanine-Cytosine
HCl	Chlorure d'hydrogène
His-tag	Marqueur de 6 histidines
HTA	Homosérine Transacétylase
HTS	Homosérine Transsuccinylase
IMAC	Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactate Déshydrogénase
LIC	Ligation Independant Cloning
MAS	Milieu Acinetobacter Succinate
N-ter	N-terminale
NaCl	Chlorure de sodium
NAD ⁺	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide et un Hydrogène
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacétique
Ni ²⁺	Nickel
NTA	Acide Nitrilotriacétique
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLP	Pyridoxal-5'-phosphate
PM	Poids Moléculaire
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
Rpm	Rotation Par Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TB	Terrific Broth
TBE	Tris, Borate, EDTA
TE	Tris-EDTA

Intermédiaires de voies métaboliques

DHK-MTPene	1,2-dihydroxy-3-ceto-5-(méthylthio)pent(1)ene
DMS	Diméthylsulfide

DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO2	Diméthylsulfone
DMSP	Diméthylsulfoniopropionate
Glu	glutamate
H ₂ S	sulfure d'hydrogène
H4MTBA	2-hydroxy-4-(methylthio)butanoate
KMBA	2-oxo acid 2-oxo 4-methylthiobutyric acid
MSA	Méthanesulfonate
MTA	S-méthyl-5-adénosine
MTA	5'-Methylthioadenosine
MTAdy	2-(méthylthio)acétaldéhyde
MT-EtOH	2-(méthylthio)éthanol
MTI	S-méthyl-5'-thiinosine
MTPA ou MMPA	3-méthylthiopropanoate ou aussi methylmercaptopropionate
MTR	S-méthyl-5-thioribose
MTR	5'-Methylthioribose
MTRP	S-(méthyl)-5-thio- α -D-ribose1P
MTRP	S-(méthyl)-5-thio- α -D-ribose1P
MTRuP	5- (méthylthio)ribulose 1-phosphate
MTXu5P	1-(methylthio)xylulose-5-phosphate
OAS	O-acétyl-L-sérine
OSS	O-succinyl-L-sérine
SAH	S-adenosyl Homocysteine
SAM	S-adenosylmethionine
SRH	S-ribosyl Homocysteine
3MP	3-mercaptopropionic acid ou 3-sulfanylpropanoate

Enzymes

HST	L-homosérine <i>O</i> -succinyltransférase
HAT	L-homosérine <i>O</i> -acétyltransférase
SAT	L-sérine <i>O</i> -acétyltransférase
SST	L-sérine <i>O</i> -succinyltransférase
CS/OASS	Cystéine synthase/ <i>O</i> -acétyl-L-sérine sulfhydrylase ou aussi <i>O</i> -acétylsérine(thiol)-lyase
CD	L-cystéine desulfhydrase
OAHS	<i>O</i> -acétylhomoserine sulfhydrylase / <i>O</i> -acétylhomosérine aminocarboxypropyltransférases
OSHS	<i>O</i> -succinylhomoserine sulfhydrylase / <i>O</i> -succinylhomosérine aminocarboxypropyltransférases
CBL	Cystathionine β -synthase
CGS	Cystathionine γ -synthase
CBL	Cystathionine β -lyase aussi appelée β -cystathionase
CBS	Cystathionine β -synthase
CGL	Cystathionine γ -lyase
MGL	Méthionine γ -lyase appelée aussi méthioninase
CDO	Cystéine dioxygénase
MetAT	Méthionine transaminase
TyrAT	Tyrosine transaminase
MTOx	Méthanethiol-oxydase
DMS-Mox	DMS-Monooxygénase
DMSP-MoX	DMSP-Monooxygénase

Liste des figures

Figure 1 : Etapes de biosynthèse de la L-cystéine à partir de la L-sérine.....	22
Figure 2 : Voies de biosynthèse bactérienne de la L-cystéine et de la S-sulfocystéine via la transsulfuration de l'O-acétyl-L-sérine (modifié de Kredich et al., 2008).....	23
Figure 3 : Voie alternative de biosynthèse de la L-cystéine chez <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
Figure 4 : Voie de biosynthèse du glutathion chez <i>E. coli</i>	25
Figure 5 : Dégradation de la L-cystéine via l'activité L-cystéine désulfurase (EC 2.8.1.7).....	26
Figure 6 : Régulation de la voie de biosynthèse de la L-cystéine (issu de Campanini et al., 2005)	28
Figure 7 : Comparaison des extrémités C-ter (décapeptides) des SAT CysE de différents organismes.29	
Figure 8 : Modèle de régulation de la biosynthèse de la L-cystéine chez <i>Bacillus subtilis</i> en présence de Cystéine (panel A) ou en condition de raréfaction de cystéine (panel B).....	30
Figure 9 : Schéma de synthèse de L-cystéinyl-[ARNt ^{Cys}] chez les archées méthanogènes. (issu de Sauerwald et al., 2005).....	31
Figure 10 : Voie de biosynthèse de la L-homosérine à partir du L-aspartate chez <i>E. coli</i>	32
Figure 11 : Voie de biosynthèse de la méthionine chez <i>E. coli</i> . (issu de Ferla et Patrick, 2014).	34
Figure 12 : Mécanisme proposé par Born et Blanchard (1999) pour le transfert de succinate à partir de succinyl-CoA vers l'homosérine, réaction catalysée par l'homosérine O-succinyltransférase.....	35
Figure 13 : Méthode ASMC de modélisation et clustering des sites actifs (issu de Bastard, Perret et al., 2017).....	37
Figure 14 : Arbre de clustering hiérarchique des protéines MetX selon la similarité structurale de leur site actif.....	38
Figure 15 : Distribution de la prédiction de l'usage d'acyl-CoA dans les familles MetA et MetX.	39
Figure 16 : Nouvelle annotation des enzymes MetX et MetA impliquées dans la voie de biosynthèse de la L-méthionine selon leur usage de l'acyl-CoA.	40
Figure 17 : Voies d'activation de l'homosérine	41
Figure 18 : Voies de biosynthèse de la L-homocystéine : voie de sulphydrylation directe (rouge) et voie de transsulfuration (vert).	42
Figure 19 : « Généalogie » des familles Interpro ayant en commun le parent IPR000277 regroupant les enzymes à PLP impliquées dans le métabolisme de la cystéine/méthionine.....	43
Figure 20 : Superposition des activités CGS mesurées dans l'étude de Kanzaki et al., 1986, et les données expérimentales obtenues dans l'étude de Bastard, Perret et al., 2017.....	44
Figure 21 : Diversité des réactions de γ -substitution sur l'O-acylhomosérine catalysées par des enzymes bactériennes.....	48
Figure 22 : Matrice de comparaison de séquences entre MetY de <i>L. meyeri</i> avec Met25 de <i>S. cerevisiae</i> , MetB d' <i>E. coli</i> et l'OSHS MetZ de <i>P. aeruginosa</i>	49
Figure 23 : Nouvelle voie de biosynthèse de la L-homocystéine médiée par la protéine thiocarboxylée HcyS décrite chez la Protéobactérie <i>Wolinella succinogenes</i> (issu de Krishnamoorthy et Begley, 2011).	50
Figure 24 : Voie de sulphydrylation directe à partir de méthanethiol comme donneur de soufre, catalysée par MetY de <i>Rhodospirillum rubrum</i> ou <i>Corynebacterium glutamicum</i>	51
Figure 25 : Biosynthèse de la L-méthionine chez les archées à partir du L-aspartate semialdéhyde (issu de MetaCyc Pathway: L-methionine biosynthesis IV (archaea)).	53

Figure 26 : Panel de réactions catalysées par les enzymes à PLP	55
Figure 27 : Illustration de l'hypothèse de Dunathan. La liaison clivable est orientée perpendiculairement au plan formé par le cycle pyridine du PLP (issu de Philips RS, 2015)	56
Figure 28 : Intermédiaire PLP aldimine et quinonoïde (Issu de Phillips RS - 2015)	57
Figure 29 : Mécanisme enzymatique de la réaction de γ -substitution telle qu'effectuée par la CGS d' <i>E. coli</i> (eCGS) sur l' <i>O</i> -succinylhomosérine.....	58
Figure 30 : Formation d'un intermédiaire quinonoïde lors de la réaction de β -élimination telle qu'effectuée par la CBL d' <i>E. coli</i>	59
Figure 31 : Voies de transsulfuration chez <i>K. pneumonia</i> W70.	60
Figure 32 : Réseau phylogénétique protéique de la principale famille d'enzymes impliquées dans les voies de sulfurylation (famille Pfam PF01053) ¹⁵⁶	61
Figure 33 : Structure de la cobalamine et de ses dérivés. Seules les parties variables ont été indiquées sur ce schéma (issu de Tanokia et al., 2010).....	64
Figure 34 : Structure de la S-adénosylméthionine (SAM)	65
Figure 35 : Cycle « AdoMet » ou cycle du méthyle activé commun aux procaryotes et à certains eucaryotes.....	66
Figure 36 : Utilisation de la SAM dans le métabolisme bactérien.....	67
Figure 37 : Voies bactériennes du cycle AdoMet ou cycle du méthyle activé. La voie Pfs(MtnN)/LuxS permet la biosynthèse de l'autoinducteur AI2 (issu de Xu et al., 2017).	68
Figure 38 : Polyamines des classes des diamines, triamines et tétraamines que l'on trouve chez les eucaryotes, les bactéries et les archeae (issu de Michael et al., 2016)..	70
Figure 39 : Voie de biosynthèse de polyamines chez la bactérie <i>Thermus thermophilus</i> . Les chemins indiqués par des flèches pointillées ne sont pas encore élucidés.....	71
Figure 40 : Voies de biosynthèse des polyamines chez l'archeae <i>Thermococcus kodakarensis</i>	72
Figure 41 : Voies de biosynthèse des autoinducteurs bactériens AI-1 (acyl-HSL) et AI-2 à partir de la SAM.	73
Figure 42 : Schéma des voies qui produisent le MTA à partir du cycle AdoMet et son recyclage.....	74
Figure 43 : Activités aminotransférases observées avec l'enzyme TyrB de <i>K. pneumoniae</i> sur L-tyrosine et L-méthionine.	76
Figure 44 : Illustration de la synténie non conservée pour les gènes impliqués dans le cycle du MTA chez <i>B. subtilis</i> versus <i>K. pneumoniae</i>	77
Figure 45 : Voie de recyclage du MTA chez <i>Bacillus subtilis</i> via le cluster de gènes <i>mtn</i>	78
Figure 46 : L'acireductone dioxygénase MtnD, une enzyme et deux réactions suivant le métal utilisé (issu de Deshpande et al., 2017)	79
Figure 47 : Assimilation du DTDP chez <i>Advenella mimigardefordensis</i> DPN7 via la formation de 3MP (issu de Meinert et al., 2017).	80
Figure 48 : « MTA-isoprenoid shunt » caractérisé chez la bactérie anaérobie facultative et phototrophique <i>Rhodospirillum rubrum</i> . (Modifié de North et al., 2017).....	81
Figure 49 : « Voie de formation de l'éthylène » caractérisée chez la bactérie anaérobie facultative et phototrophique <i>Rhodospirillum rubrum</i>	82
Figure 50 : Production de sulfure d'hydrogène H ₂ S à partir de L-cystéine via l'activité L-cystéine désulfhydrase.	84
Figure 51 : Catabolisme de la cystéine chez les eucaryotes via la cystéine dioxygénase CDO.	85
Figure 52 : Résumé des voies de transsulfuration reliant la biosynthèse de la L-méthionine et celle de la L-cystéine.....	86

Figure 53 : Formation de l'intermédiaire énamine/imine après action sur la thréonine de l'enzyme déshydratase ilvA (issu de Lambrecht et al., 2012).	87
Figure 54 : Image de synténie des gènes codant pour les enzymes CBS et CGL chez <i>B. subtilis</i> et <i>K. pneumoniae</i>	87
Figure 55 : Activités de γ -élimination (vert) et β/γ -lyase (bleu) testées dans l'étude de MetC de <i>Lactobacillus casei</i> par Irmeler et al. (2009).....	88
Figure 56 : Arbre taxonomique de la famille CBL/CGL lyase chez les bactéries lactiques.	90
Figure 57 : Voie de recyclage de la méthionine via le le méthanethiol. Les molécules clés ont été indiquées sur le schéma. Les flèches en pointillé indiquent plus d'une réaction.	93
Figure 58 : Biosynthèse du méthanethiol dans la voie de recyclage du soufre. STR3 est la déméthiolase de <i>Clonostachys rosea</i> qui a une activité KMBA thiolase (Li et al., 2016).	94
Figure 59 : Réaction catalysée par la méthionine γ -lyase (4.4.1.11). Source : Brenda	95
Figure 60 : Diversité de séquences des MGL décrites dans la littérature illustrée par une matrice d'identité de séquences. Matrice construite après alignement des séquences avec Clustal omega... ..	97
Figure 61 : Voie métabolique proposée par Bonnarme chez <i>L. lactis</i> sp. Cremosis via la formation de methylthioacetaldehyde.	98
Figure 62 : Couplage de la réaction de fenton et de la biosynthèse de méthanethiol à partir de KMBA	99
Figure 63 : Diverses voies de recyclage de synthèse de molécules soufrées volatiles à partir de la méthionine chez les bactéries lactiques (issu de « Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, Book W.N. Konings,– 1999).	100
Figure 64 : Réaction catalysée par la méthanethiol oxydase (EC 1.8.3.4).	101
Figure 65 : Voies de recyclage de la L-méthionine pour la production de sulfide H ₂ S chez les bactéries.	102
Figure 66 : Voie métabolique proposée pour la biosynthèse du DMSP chez l'algue marine <i>Enteromorpha intestinalis</i> et d'autres algues.	107
Figure 67 : Biosynthèse du DMSP à partir de la L-méthionine via la synthèse de diméthylsulfoniopropionaldéhyde (DMSP-aldehyde) chez la plante <i>Spartina</i> (issu de Rousseau et al., 2017).....	108
Figure 68 : Catabolisme des acides aminés par la voie de Eirlich chez les levures aboutissant à la production d'alcool (issu de Etschmann et al., 2008)	109
Figure 69 : Résumé des grandes voies de synthèse à partir de la L-méthionine.	110
Figure 70 : Voies de conversion du DMSP et du méthanethiol en DMS.	111
Figure 71 : Inventaire des voies d'assimilation du DMSP et du DMS atmosphérique chez les bactéries.	115
Figure 72 : Dégradation des composés aromatiques par la voie du β -cétoadipate chez ADP1 organisé en « archipèle métabolique » (issu de de Berardinis et al., Current Opinion in Microbiology, 2009).117	117
Figure 73 : Exploration du métabolisme d'ADP1 au laboratoire (issu de de Berardinis et al., Current Opinion in Microbiology, 2009).....	118
Figure 74 : La présence d'un résidu chargé (arginine) est déterminante pour l'usage du succinyl-CoA chez MetX-HST _{ADP1} comparé à MetX-HAT _{influenzae} (modifié de Bastard et al., 2017)	119
Figure 75 : Biosynthèse de la L-méthionine chez <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1 selon l'annotation	120
Figure 76 : Biosynthèse de la Fimsbactin A chez ADP1 (Figure issue de Proschak et al., 2013). FbsJ est l'ornithine décarboxylase.....	122
Figure 77 : Biosynthèse de la L-cystéine à partir de sulfate chez ADP1.....	123

Figure 78 : Cladogramme taxonomique du NCBI et prédictions des activités des enzymes MetA et MetX	143
Figure 79 : Réactions d'acylation de la L-homosérine et de la L-sérine testées sur les deux enzymes fongiques Cys2.	145
Figure 81 : Réaction d' <i>O</i> -succinylation de la boc-L-sérine	149
Figure 81 : Mécanisme de déprotection de la <i>N</i> -boc- <i>O</i> -succinylsérine. R-NH ₃ = <i>O</i> -succinyl-L-sérine.	150
Figure 82 : Chromatogrammes LC-MS du produit de la réaction SST réalisée par Cys2 _{pombe} et du standard OSS.	151
Figure 83 : Illustration du phénomène d'isomérisation de l' <i>O</i> -acétyl-L-sérine à pH basique.....	152
Figure 84 : Mise en évidence de la production d'OSS par Cys2 _{pombe}	153
Figure 85 : Description du protocole de culture et d'extraction du métabolome de <i>S. pombe</i> adapté de celui mis au point pour ADP1 (Stuani et al., 2014).....	156
Figure 86 : Détection de l' <i>O</i> -succinyl-L-sérine dans le métabolome de <i>S. pombe</i>	157
Figure 87 : Arbre de clustering hiérarchique des sites actifs de MetX généré par ASMC (issu de Bastard et al., 2017).	158
Figure 88 : Arbre phylogénétique des MetX possédant une activité L-homosérine <i>O</i> -acyltransférase.	160
Figure 89 : Contextes génomiques de gènes codant pour des MetX du groupe MetX-G3 de Xanthomonadales.	161
Figure 90 : Chromatogrammes LC-MS du produit de la réaction SST réalisée par MetX-HST2 _{campestris} G3a.	163
Figure 91 : Détection de l'OSS dans le métabolome de <i>X. campestris</i>	166
Figure 92 : Alignement de séquence des deux protéines MetX-HST2 et Cys2-like de <i>X. campestris</i> . .	167
Figure 93 : Exploration expérimentale des réactions catalysées par les cystéines synthases (CysK/Cys1a) d'organismes contenant une MetX-SST.	170
Figure 94 : Dosage du succinate et de l'acétate relargués lors de la synthèse de la L-cystéine à partir de l'OSS ou de l'OAS, via l'utilisation des kits Megazyme K-SUCC 04/17 et K-ACETAK 04/14 respectivement.	171
Figure 95 : Mise en évidence de la formation de L-cystéine par CysK _{pombe} en présence d'OSS.	172
Figure 96 : Comparaison du comportement cinétique de la transsulfuration de l'OSS et de l'OAS par les cystéine synthases CysK de <i>X. campestris</i> et <i>F. aurantia</i>	175
Figure 97 : Comparaison des décapeptides présents en C-ter des SST testées avec la partie C-ter de CysE d' <i>E. coli</i> K12.	177
Figure 98 : Alignement multiple des CysK d' <i>E. coli</i> , <i>A. baylyi</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. abortus</i> , <i>X. campestris</i> , <i>F. aurantia</i> et <i>S. pombe</i>	178
Figure 99 : Voies de biosynthèse de la L-cystéine chez les procaryotes et les fungi.	181
Figure 100 : Arbre de décision d'annotation des familles MetX et MetA (issu de Bastard & Perret et al., 2017).....	182
Figure 101 : Cladogramme taxonomique des MetX et MetA et répartition des activités HAT, HST et SST.	183
Figure 102 : Voie proposée de biosynthèse de la D-cyclosérine chez <i>S. lavendulae</i> ATCC11924 (mise à jour dans Uda et al., 2013).	184
Figure 103 : Distribution chez les procaryotes des enzymes annotées comme SST par la règle HAMAP MF_00296	186

Figure 104 : Exemples de conservation en synténie du cluster de gènes <i>dcs</i> de <i>S. levandulae</i> impliqués dans la voie de biosynthèse de l'antibiotique D-cyclosérine.	187
Figure 105 : Alignement de séquences multiples de l'ensemble des enzymes de la famille MetX.	188
Figure 106 : Chez <i>B. subtilis</i> ou <i>P. aeruginosa</i> , la CGL est homologue aux enzymes impliquées dans la biosynthèse de la L-méthionine.	192
Figure 107 : Voies de transsulfuration réverse recherchée chez ADP1.	196
Figure 108 : Réaction de β -élimination sur différentes molécules soufrées et dosage du pyruvate via le test couplé à la LDH.	197
Figure 109 : Mise en évidence de la synthèse enzymatique de L-cystathionine en présence de DL-homocystéine et d'OAS.	198
Figure 110 : Exploration des activités cystathionine γ -lyase (CGL) et cystathionine β -lyase (CBL) sur les enzymes à PLP d'ADP1.	199
Figure 111 : Description de la campagne de phénotypage sur différentes sources de soufre réalisée sur la banque de mutants KO d'ADP1.	201
Figure 112 : Carte comparant la croissance des mutants KO d'ADP1 sur L-cystéine vs L-méthionine.	202
Figure 113 : Contexte génomique chez ADP1 du putatif régulateur transcriptionnel de la famille AraC (ACIAD2084), essentiel sur L-méthionine. Analyse réalisée via MicroScope/MaGe.	203
Figure 114 : Voie de recyclage de la méthionine vers la cystéine via le méthanethiol.	204
Figure 115 : Transporteur CysAWTP et contexte génomique. A. Composition et rôle du complexe CysAWTP. B. Contexte génomique du gène <i>cysA</i>	204
Figure 116 : Découplage des voies de transsulfuration réverse et de recyclage de la L-méthionine via la voie du méthanethiol et de la production d' H_2S	206
Figure 117 : Méthode de délétion de <i>cysI</i> par intégration d'une cassette portant un gène de résistance à la kanamycin.	207
Figure 118 : Principe du phénotypage en Bioscreen.	208
Figure 119 : Cinétiques de croissance de $\Delta CysI$ sur différentes sources de S.	209
Figure 120 : Cinétiques de croissance des mutants $\Delta cysI$, $\Delta ssuD$ et $\Delta cysM$ en présence de S-méthylcystéine.	210
Figure 121 : Voie d'assimilation de la S-méthyl-cystéine proposée chez <i>Bacillus subtilis</i> (extrait de la figure 1 de Chan et al., 2013). Les auteurs ont ombré les liaisons soufrées oxydées dans cette voie.	210
Figure 122 : Cinétiques de croissance des mutants $\Delta CysM$, $\Delta CysI$, $\Delta SsuD$ sur L-méthionine, méthanethiol et méthanesulfonate.	212
Figure 123 : Schéma qui résume l'hypothèse d'une possible voie de recyclage de la L-méthionine chez ADP1.	213
Figure 124 : Détection de l'activité méthionine γ -lyase à 340nm via le test couplé à la GDH.	214
Figure 125 : Cinétiques de croissance des mutants $\Delta CysI$ et $\Delta SsuD$ sur KMBA.	214
Figure 126 : Détection de l'activité méthionine transaminase à 340nm via le test couplé à la GDH.	215
Figure 127 : Résultats du criblage de la plaque d'enzymes à PLP d'ADP1 sur l'activité Met-TAM.	216
Figure 128 : Formation de la méthionine à partir du KMBA telle que suspectée chez ADP1.	217
Figure 129 : Cinétiques de croissance du phénotype sauvage d'ADP1 sur MTA, MTR et méthionine.	218
Figure 130 Cycles du méthyl activé (AdoMet) et cycle du MTA pour le recyclage de la méthionine chez ADP1. Les voies indiquées en rouge restent des voies hypothétiques.	219

Figure 131 : Principe général du protocole d'extraction de transcriptomes issus de cultures d'ADP1 sur différentes sources de soufre.....	221
Figure 132 : Vue globale du niveau d'expression en présence de L-méthionine (M) et L-cystéine (C) par comparaison avec le sulfate.....	223
Figure 133 : Homologues des régulateurs transcriptionnels CysB et Cbl entre ADP1, K12 et autres bactéries modèles. Les groupes de synténies ont été analysés via MicroScope/MaGe.....	229
Figure 134 : Alignements multiples des CysB et Cbl connus.....	230
Figure 135 : Conservation de synténie entre le cluster de gène Cbl chez <i>B. cenocepacia</i> et ADP1....	231
Figure 136 : Structures des fimsbactines A à F d'ADP1 (issu de Proschak et al., 2013).....	233
Figure 137 : Cinétiques de croissance de la souche sauvage d'ADP1 sur les possibles intermédiaires de la voie de recyclage de la méthionine et le DMSP (48h).....	235
Figure 138 : Oxydation du dimethylsulfone (DMSO ₂) en H ₂ S chez <i>P. putida</i> DS1 (issu de Kouzuma et al., 2008).....	236
Figure 139 : Recherche des synténies du cluster de gène SfnEG de <i>P. putida</i> DS1 (GB1) chez <i>P. aeruginosa</i> et ADP1.....	237
Figure 140 : Cinétiques de croissance des mutants ADP1 Δ CysI, Δ SsuD et Δ MsuD sur les possibles intermédiaires de la voie de recyclage de la méthionine (24h).....	238
Figure 141 : Cinétiques de croissance sur DMSP et MTPA comparées aux autres sources de S déjà testées sur Δ msuD et Δ ssuD.....	240
Figure 142 : Stratégies utilisées pour rechercher une méthaneithiol S-méthyltransférase chez ADP1 en utilisant la séquence de MddA caractérisée de <i>Pseudomonas deceptionensis</i>	241
Figure 143 : Cluster de gènes codant pour une S-méthyltransférase et un amino acid transporter induit en présence de L-méthionine..	242
Figure 144 : Motifs conservés par les DMSP lyases de la famille à Cupin (issu de Lei et al., 2018)....	243
Figure 146 : Courbes de croissance (24h) du mutant Δ cysI sur taurine et ses dérivés.....	247
Figure 147 : Dégradation de l'acide djenkolique catalysée par une S-alkylcystéine α,β -lyase (issu de Kamitani et al., 1991).....	248
Figure 148 : Croissance (24h) du mutant Δ cysI sur acide djenkolique.....	248
Figure 149 : Voies possibles d'assimilation de molécules soufrées chez ADP1.....	251

Liste des tableaux

Tableau 1 : Unités de transcription du régulon cystéine chez <i>E. coli</i> (modifié de Kredich et al., 2008).	27
Tableau 2 : Classement des enzymes à PLP en 7 groupes structuraux.	56
Tableau 3 : Bactéries pour lesquelles une activité MGL a été décrite dans la littérature.	96
Tableau 4 : Programme des PCR 2 et 3 (description des cycles en fonction des durées et des températures).	129
Tableau 5 : Programme de la PCR multiplex (description des cycles en fonction des durées et des températures).	129
Tableau 6 : Préparation de la réaction de PCR pour les candidats non GC riches.	136
Tableau 7 : Préparation de la réaction de PCR pour les candidats GC riches.	136
Tableau 8 : Conditions MRM pour la détection de l'acétyl-L-sérine et de la succinyl-L-sérine.	140
Tableau 9 : Activités spécifiques L-homosérine et L-sérine <i>O</i> -acyltransférases de Cys2 fongiques. ...	146
Tableau 10 : Activités spécifiques L-homosérine et L-sérine <i>O</i> -acyltransférases de MetX-HAT, MetX-HST1 et de MetA.	147
Tableau 11 : Paramètres cinétiques de Cys2 de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	154
Tableau 12 : Activités spécifiques L-homosérine et L-sérine <i>O</i> -acyltransférases de MetX-HST2 procaryotes.	162
Tableau 13 : Paramètres cinétiques des Cys2-like de deux Xanthomonadales.	164
Tableau 14 : Activités spécifiques L-homosérine et L-sérine <i>O</i> -acyltransférases des enzymes mutées MetX-HST2 et MetX-SST de <i>X. campestris</i> , ainsi que de leur forme sauvage (wt) respective.	168
Tableau 15 : Activités spécifiques L-homosérine et L-sérine <i>O</i> -acyltransférases des enzymes mutées MetX-HST2 et MetX-SST de <i>X. campestris</i> , ainsi que de leur forme sauvage (wt) respective.	169
Tableau 16 : Paramètres cinétiques de la cystéine synthase Cys1a de <i>S. pombe</i> (issu de Bastard et al., 2017).....	172
Tableau 17 : Paramètres cinétiques des cystéine synthases CysK de <i>X. campestris</i> et de <i>F. aurantia</i>	176
Tableau 18 : Comparaison des activités spécifiques L-sérine <i>O</i> -succinyltransférases (SST) des CS A et B de <i>X. campestris</i> , de la CS A d' <i>A. baylyi</i> et de la CS B de <i>S. pombe</i>	179
Tableau 19 : Paramètres cinétiques de la CS CysK d' <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1 (Uniprot ID : Q6FBQ5).	180
Tableau 20 : Comparaison des activités spécifiques SST/SAT et HST/HAT de l'enzyme MetX de <i>S.lavendulae</i> encodée par le gène <i>dcsE</i>	185
Tableau 21 : MetX eucaryotes non fongiques prédites SST.....	189
Tableau 22 : Distribution des embranchements de champignons ayant un gène <i>metX</i> prédits pour coder pour une SST (données issues de l'analyse du dataset 4 de Bastard, Perret et al., 2017).....	189
Tableau 23 : Comparaison des activités spécifiques HAT/HST et SAT/SST de MetX de la levure <i>Candida antartica</i> (MetX _{antartica}) et de la Cione (MetX _{savignyi}).....	191
Tableau 24 : Liste des enzymes identifiées comme PLP-dépendantes chez ADP1 et partageant les signatures IPR001926 et IPR015424.	194
Tableau 25 : Gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la L-méthionine chez ADP1 dont l'expression varie significativement (Padj <0,05) en présence de L-méthionine versus L-sulfate.....	222
Tableau 26 : Liste des 90 gènes induits en l'absence de sulfate et organisés en 8 clusters.	226
Tableau 27 : Pourcentages d'identité entre CysB et Cbl connues.	230

Tableau 28 : Modification des niveaux d'expression du cluster de gènes impliqués dans la synthèse des fimbactines.	233
Tableau 29 : Expression différentielle des gènes impliqués dans la réduction des sulfites chez ADP1.	234
Tableau 30 : Liste des monooxygénases dont l'expression est induite par la présence de L-méthionine chez ADP1.....	239
Tableau 31 : Liste des sources de soufre testées sur ADP1 et les mutants $\Delta msuD$, $\Delta ssuD$, $\Delta cysI$ et $\Delta cysM$	245

Liste des annexes

Annexe 1 : Résumé non exhaustif des activités CGS et CBL décrites dans la littérature..	286
Annexe 2 : Résumé non exhaustif des activités <i>O</i> -acyl-L-homosérine sulfhydrylases (OAHS et OSHS) décrites dans la littérature.	287
Annexe 3 : Méthode de clonage LIC (Ligation Independant Cloning) ou clonage sans enzyme de restriction ni ligation, décrite par Aslanidis et de Jong en 1990.....	288
Annexe 4 : Spectres RMN de la <i>N</i> -Boc- <i>O</i> -succinyl-L-sérine.....	289
Annexe 5 : Spectres RMN de l' <i>O</i> -succinyl-L-sérine.....	290
Annexe 6 : Mise en évidence de la production de L-cystéine à partir d'OSS et de Na ₂ S via CysK _{pombe} .	291
Annexe 7 : Comportement cinétique allostérique de l'enzyme CysK _{ADP1} lors de la transsulfuration de l'OSS.....	292
Annexe 8 : Principe général de la mutagenèse dirigée via le kit QuickChange II d'Agilent Technologies.	293
Annexe 9 : Protocoles de RNAseq appliqué aux ARNm extraits de procaryotes selon la quantité disponible.	294
Annexe 10 : Evaluation de la qualité du séquençage et du transcriptome obtenu sur la condition sulfate.....	295
Annexe 11 : Evaluation de la qualité du séquençage et du transcriptome obtenu sur la condition cystéine.	296
Annexe 12 : Evaluation de la qualité du séquençage et du transcriptome obtenu sur la condition méthionine.	297
Annexe 13 : Expression de 55 protéines de stress dans les 3 conditions testées.....	298
Annexe 14 : Expression des 37 gènes impliqués dans la biosynthèse de la L-méthionine.	299
Annexe 15 : Liste des 90 gènes surexprimés (log fold change ≥2,5) en présence de L-méthionine vs sulfate.....	300
Annexe 16 : Liste des 25 ACIADs exprimés sur sulfate avec un nombre de lectures >100 et au moins 3 fois sous-exprimés sur L-méthionine..	301

I Introduction

Le soufre (S), élément biochimique et géochimique important, joue un rôle primordial dans le vivant : non seulement c'est un constituant des acides aminés soufrés essentiels que sont la cystéine et la méthionine, composants structuraux des protéines, mais c'est aussi un élément très réactif qui permet de nombreuses et diverses fonctions enzymatiques grâce, en outre, à l'implication de la fonction thiol de la cystéine dans des triades catalytiques. Le soufre est par ailleurs présent dans de nombreux cofacteurs enzymatiques, que ce soit dans des substances organiques actives majeures comme le coenzyme A ou encore les vitamines B1 (la thiamine ou aneurine) et B8 (la biotine ou vitamine H ou encore coenzyme R), ou bien au sein de protéines sous forme inorganique Sⁱ dans des clusters Fe-S permettant le transport d'électrons (cas des ferredoxines). Les molécules soufrées participent également à l'homéostasie redox grâce à leur rôle anti-oxydant lors des stress oxydatifs. Enfin, la méthionine, en plus d'être un acide aminé protéinogène, est aussi un composant clef du métabolisme via la synthèse de la S-adénosylméthionine (SAM), principal transporteur de groupement méthyle dans les cellules. La diversité des processus métaboliques microbiens liés au soufre (réduction des sulfates, dismutation, oxydation des sulfures) et celle des différentes familles de molécules soufrées participent ainsi plus globalement à l'équilibre et à la stabilité du cycle biogéochimique du soufre, et ce notamment dans les écosystèmes marins. Par exemple, le diméthylsulfoniopropanoate (DMSP), principalement produit par les algues et les plantes, est l'un des principaux composés soufrés présent dans l'environnement et joue un rôle écologique majeur. Outre son rôle dans la chaîne trophique des bactéries marines et du sol capables d'assimiler le DMSP comme source de soufre, le catabolisme du DMSP engendre le sulfure de diméthyle (DMS), molécule volatile impliquée dans la régulation du climat et la formation des nuages.

De nombreux microorganismes peuvent utiliser le sulfate inorganique, source abondante de soufre facilement assimilable et disponible dans la biosphère aérobie, et les sulfonates, très répandus également dans la nature. Ces composés sont incorporés via différents transporteurs et transformés en sulfure d'hydrogène (H₂S) pour conduire généralement à la biosynthèse de la L-cystéine. En revanche, comme nous le verrons ultérieurement, les microorganismes utilisent en général les sulfonates uniquement dans des conditions limitées en sulfate/soufre par le biais de régulations qui seront développées dans cette introduction.

Les molécules soufrées ont également un fort intérêt industriel, leur production se faisant souvent à grande échelle. Pour la synthèse de la L-méthionine, utilisée par exemple comme additif déterminant pour l'alimentation animale, de nombreux brevets existent pour des productions industrielles allant jusqu'à plusieurs centaines de tonnes par an (pour une revue, voir celle de Wilke T., 2014¹). Illustrant la dynamique de ces recherches, une série de brevets déposés en 2017 par l'entreprise Arkema permet d'améliorer le processus de production de cet acide aminé avec la mise au point d'une cascade multienzymatique produisant du méthane-thiol^{2,3}, utilisé comme précurseur de synthèse, et qui était précédemment produit par voie chimique. La synthèse de L-cystéine n'est pas en reste et présente également un fort intérêt pour les industries pharmaceutique, agroalimentaire et cosmétique. Dans l'introduction de ce manuscrit nous allons décrire les voies de biosynthèse connues de ces deux acides aminés soufrés protéinogènes, ainsi que leurs voies de recyclage. La littérature sur le sujet est extrêmement abondante car les voies sont très variées selon les organismes. Il sera donc difficile d'être exhaustif malgré une revue bibliographique étendue.

Nous verrons également dans cette introduction pourquoi *Acinetobacter baylyi* ADP1 (ADP1), une bactérie du sol aux capacités de dégradation des molécules aromatiques remarquables, est utilisée au laboratoire comme organisme modèle pour l'élucidation de nouvelles fonctions enzymatiques et voies métaboliques. L'observation de phénotypes non prédits par l'annotation du génome d'ADP1 a abouti à l'initiation de l'étude du métabolisme du soufre avec deux axes : (1) l'étude de la biosynthèse de la L-méthionine (L-Met) et plus spécialement l'étude des familles d'enzymes non homologues MetX et MetA catalysant l'acylation de l'homosérine dans le monde vivant, première étape de cette voie ; (2) l'exploration des voies de recyclage de la L-méthionine chez ADP1, ainsi que les voies d'assimilation de certaines molécules soufrées. Les deux objectifs suivis tout au long de cette thèse ont donc été d'une part de redéfinir le rôle exact d'enzymes appartenant à la famille MetX effectuant l'acylation de la sérine et non de l'homosérine, et d'autre part de tenter d'élucider les voies métaboliques permettant à ADP1 de métaboliser la méthionine afin de s'en servir comme source de soufre.

1.1 Voies de biosynthèse de la L-cystéine

1.1.1 Sulphydrylation

1.1.1.1 Activation de la L-sérine

Chez les bactéries et les plantes, la L-cystéine est le précurseur de la plupart des métabolites contenant du soufre, y compris la L-méthionine et le glutathion, molécule anti-oxydante. La voie de biosynthèse de la L-cystéine joue donc un rôle important dans l'incorporation du soufre inorganique dans les composés organiques.

La voie de biosynthèse de la cystéine à partir de la L-sérine est une conversion en deux étapes, via l'intermédiaire O-acétyl-L-sérine (OAS). La voie a été étudiée chez les bactéries⁴, les archées⁵ et les plantes⁶. La première étape consiste ainsi en l'acétylation de la L-sérine par une sérine O-acétyltransférase (SAT, EC 2.3.1.30). Les SAT sont majoritairement codées par les gènes *cysE* mais aussi par des gènes de type *srpH* (figure 1). Le premier représentant caractérisé de SrpH (Uniprot ID : Q59967) est codé par un gène plasmidique de *Synechococcus elongatus*⁷ et n'a aucune homologie de séquence avec sa SAT chromosomique (*CysE_{elongatus}*, Uniprot ID : Q59967) ou *CysE_{coli}* (Uniprot ID : P0A9D4). Ces deux isoenzymes appartiennent cependant à la même famille d'enzymes ayant le motif hexapeptide (IPR001451) et partagent la même signature Interpro commune aux SAT (IPR005881). On retrouve par contre des homologues de SrpH chez des protistes parasites du genre *Entamoeba*⁸.

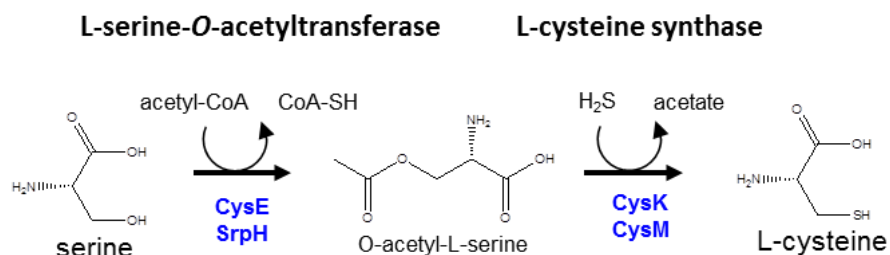


Figure 1 : Etapes de biosynthèse de la L-cystéine à partir de la L-sérine.

La seconde étape, la sulfhydrylation de l'OAS, permet l'incorporation du soufre contenu dans le sulfure d'hydrogène (H₂S) et est catalysée par une enzyme dépendante du pyridoxal-phosphate (PLP) : il s'agit de la cystéine synthase (CS, EC 2.5.1.47), aussi appelée O-acétyl-L-sérine sulfhydrylase (OASS) ou encore O-acétylsérine(thiol)-lyase (anciennement EC 4.2.99.8). Pour la suite nous garderons le nom de cystéine synthase. Deux gènes codent pour cette enzyme : *cysK* (OASS A) et *cysM* (OASS B). CysK et CysM sont des CS isofonctionnelles qui se retrouvent toutes les deux chez certains organismes comme chez *E. coli* K12⁹, chez qui elles partagent 43 % d'identité de séquence, ou encore chez *Salmonella typhimurium*¹⁰. En outre, l'isoenzyme CysM est utilisée préférentiellement dans des conditions de croissance anaérobie¹⁰ et est capable d'utiliser le thiosulfate à la place du sulfure pour produire la S-sulfo-L-cystéine¹¹ (figure 2). Chez *E. coli* par exemple, ces enzymes sont également impliquées dans la dégradation de la L-cystéine en H₂S et pyruvate grâce à leur activité L-cystéine désulfhydrase (CD ; existe aussi sous le nom « desulfidase »), bien qu'il faille noter que l'activité CD y soit également catalysée par des enzymes issues d'au moins trois autres gènes. Chez d'autres organismes, on ne retrouve néanmoins qu'une seule de ces isoenzymes, comme c'est le cas chez *Burkholderia cenocepiae* où seul l'orthologue CysM a pu être identifié¹².

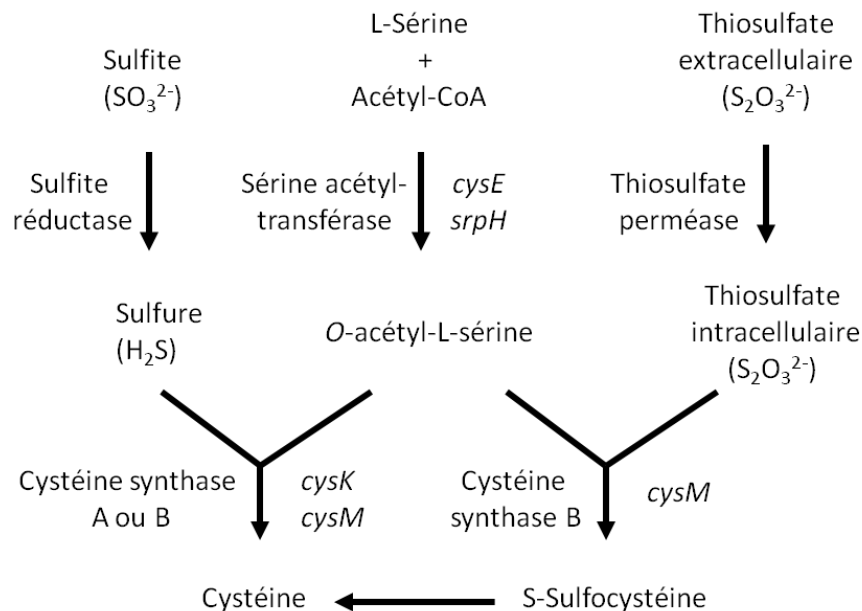


Figure 2 : Voies de biosynthèse bactérienne de la L-cystéine et de la S-sulfocystéine via la sulfhydrylation de l'O-acétyl-L-sérine (modifié de Kredich et al., 2008).

Une variante de la voie de sulfhydrylation via la L-sérine activée a été décrite chez *Mycobacterium tuberculosis* et est présentée dans la figure 3. Bien qu'il était pensé initialement que le substrat physiologique de CysM_{tuberculosis} (Uniprot ID : P9WP53) était l'OAS¹³, divers travaux ont par la suite montré que son substrat réel était la 3-phospho-L-sérine^{14,15}, intermédiaire de la biosynthèse de la L-sérine et produit en 2 étapes à partir du 3-phosphoglycérate via SerA et SerC. En effet chez *M. tuberculosis*, où la voie classique de sulfhydrylation catalysée par CysE et CysK existe également, une voie alternative reposant sur CysM permet de former de la L-cystéine, en catalysant dans un premier temps : l'addition d'O-phosphosérine à l'extrémité C-terminale thiocarboxylate de la protéine CysO (CysO-COSH), une sulfur-carrier protéine similaire à ThisS et Moad chez *E. coli*, générant ainsi le conjugué [CysO]-Gly-NH-CH₂-C(O)-S-L-cystéine¹⁴. Puis dans un second temps, l'hydrolyse de ce

conjugué par la carboxypeptidase Mec (Uniprot ID : P9WHS1), dont Burns et al. ont montré la dépendance au Zn^{2+} , permet de libérer la L-cystéine¹³. Les sulfur-carrier protéines possèdent à leur extrémité C-terminale un motif Gly-Gly, dont le groupement carboxylate est d'abord adénylé puis sulfurylé par une sulfurylase afin de régénérer le thiocarboxylate CysO-C(O)SH. Dans le cas de CysO, ces deux étapes sont catalysées par la protéine bifonctionnelle [sulfur-carrier protéine CysO]-sulfur ligase, codée par le gène *moeZ*¹³. Quant aux deux CS CysK et CysM, elles sont organisées dans deux opérons distincts, l'un rassemblant *cysK* et *cysE* (*Rv2334* et *Rv2335* respectivement) et l'autre rassemblant les gènes *mec*, *cysO* et *cysM* (*Rv1334*, *Rv1335* et *Rv1336* respectivement).

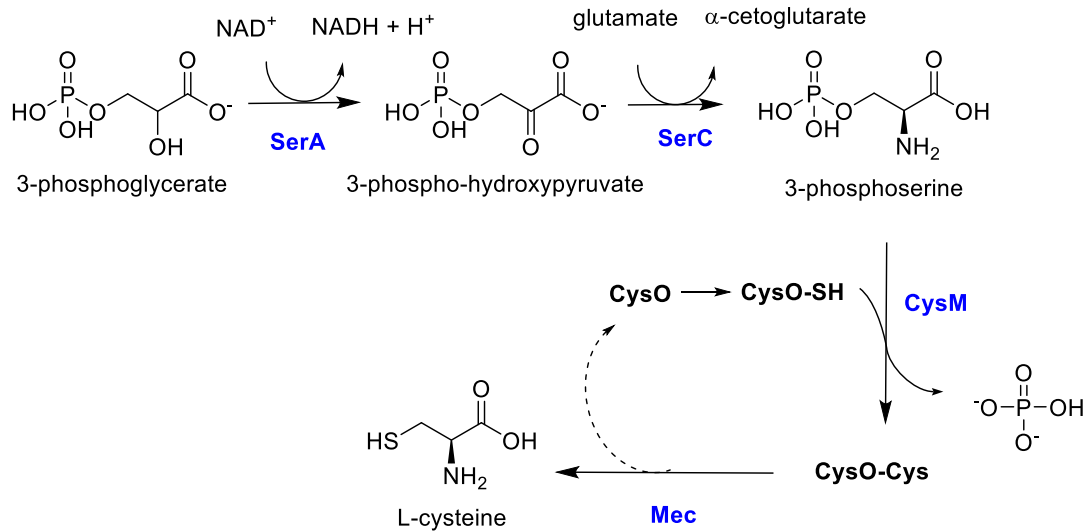


Figure 3 : Voie alternative de biosynthèse de la L-cystéine chez *Mycobacterium tuberculosis*. Chez cette bactérie, cette voie coexiste avec la voie classique CysE-CysK de sulfhydrylation de la L-sérine.

Finalement, chez *Saccharomyces cerevisiae*, organisme modèle pour l'étude du métabolisme du soufre chez les levures, ainsi que chez certaines bactéries, la L-cystéine est synthétisée à partir de la L-méthionine par la voie de transsulfuration réverse (cette voie sera développée dans la section 1.3.2.2)¹⁶. Il est à noter que la synthèse *de novo* de la L-cystéine n'existe pas chez les mammifères, ce qui fait des enzymes de cette voie des cibles de choix pour le développement de médicaments.

1.1.1.2 Cystéine synthases et régulation de la biosynthèse de la L-cystéine

En raison de la réactivité du groupement thiol –SH, le métabolisme de la cystéine est étroitement contrôlé en réponse aux variations environnementales en sources de soufre afin d'éviter une accumulation de la L-cystéine. Plusieurs stratégies permettent d'éviter cette accumulation selon deux principes : (1) éliminer la cystéine déjà formée par différents moyens, par exemple grâce à l'action des cystéines désulphydrases, ou bien encore en l'utilisant pour la formation de l'agent anti-oxydant glutathion (figure 4) ; (2) empêcher sa synthèse grâce à la rétro-inhibition de la première enzyme (SAT) de la voie par le produit final de celle-ci (c.-à-d. la L-cystéine), par la modulation de l'activité de ces enzymes via la formation/dissociation du complexe cystéine synthase et, enfin, en régulant globalement les voies de biosynthèse et les transporteurs des molécules soufrées qui amènent à la biosynthèse de la L-cystéine¹⁷.

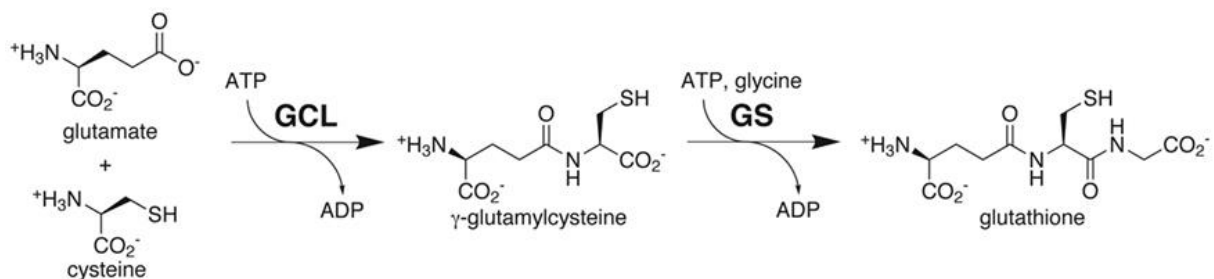


Figure 4 : Voie de biosynthèse du glutathion chez *E. coli*. GCL = glutamate-cystéine ligase (gène *gshA*) ; GS = glutathion synthase (gène *gshB*).

Globalement, le métabolisme du soufre est régulé non seulement par certains produits de la voie comme la L-cystéine, qui inhibe la SAT CysE, ou encore via l'intermédiaire OAS, mais aussi chez les bactéries par plusieurs protéines régulatrices de la famille LysR (dont MetB et Cbl chez *E. coli* ou CymR chez *Bacillus subtilis*, notamment), qui coordonnent l'expression des gènes impliqués dans le transport et le métabolisme des molécules soufrées¹⁸ (pour une revue des régulateurs transcriptionnels de type LysR ou LTTR, voir Maddocks & Oyston - 2008¹⁹). De plus, en raison de la cytotoxicité de la L-cystéine, son niveau intracellulaire est rigoureusement contrôlé par plusieurs modes de régulation, y compris sa dégradation par les cystéine désulphydrases (EC 4.4.1.28) citées précédemment et les cystéine désulfurases (EC 2.8.1.7). Ces dernières, qui sont des enzymes homodimériques également dépendantes du PLP, catalysent la conversion de la L-cystéine en L-alanine et en un accepteur S-sulfanyl, via la formation d'un intermédiaire persulfide RSSH sur un résidu cystéine conservé entre les deux sous-unités de la protéine (figure 5). Ces enzymes jouent un rôle déterminant dans la biosynthèse des clusters Fe-S, de la thiamine, de la biotine, des thionucléosides dans les tRNA, du lipoate, de la molybdoptérine ou encore du NAD²⁰.

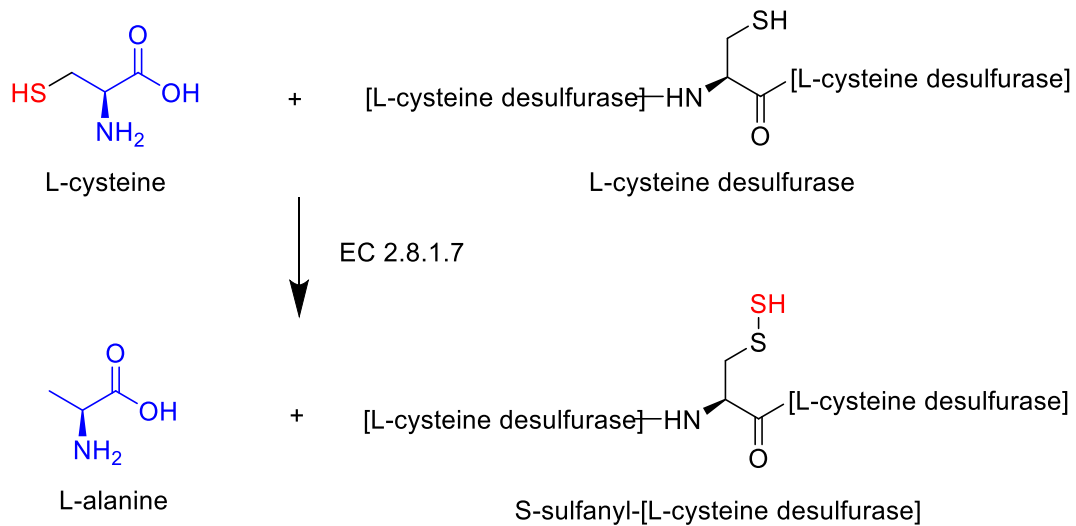


Figure 5 : Dégradation de la L-cystéine via l'activité L-cystéine désulfurase (EC 2.8.1.7).

- **Régulation transcriptionnelle par CysB**

Chez *E. coli*, CysB, un régulateur transcriptionnel de type LysR très bien conservé chez les bactéries Gram négatives, joue un rôle clef non seulement dans l'expression des gènes *cys* responsables de l'assimilation des sulfates, mais aussi dans celle des gènes qui prennent le relais en cas de « pénurie » de sulfate (appelés « sulfate starvation-induced (SSI) genes »). CysB utilise la *N*-acétyl-L-sérine (NAS, isomère spontané naturel de l'*O*-acétyl-L-sérine -OAS) comme signal de conditions limitantes en soufre (figure 6). En effet, chez *S. typhimurium* et *E. coli*, Kredich et ses collaborateurs ont montré que le NAS agit comme inducteur de CysB, facilitant sa liaison à l'ADN et favorisant la transcription du régulon L-cystéine ainsi soumis à la disponibilité en soufre. Le régulon cystéine regroupe l'ensemble des gènes qui participent de près ou de loin à la synthèse de la L-cystéine (tableau 1), incluant également les gènes impliqués dans la biosynthèse du H₂S à partir du sulfate (*cysDNC* et *cysJIH*), ainsi que les transporteurs liés à l'import de la L-cystine, du glutathion, du sulfate ou encore du thiosulfate. Ce régulon regroupe également les gènes impliqués dans le métabolisme des alcanesulfonates et leurs transporteurs (pour une revue voir Kredich, 2008), dont l'expression est médiée par un deuxième régulateur de transcription, Cbl ("CysB-like"), qui est lui-même sous le contrôle de CysB. Chez *E. coli*, l'expression de Cbl est ainsi essentielle à l'expression des gènes *tau* et *ssu* impliqués dans le métabolisme des alcanesulfonates²¹ (tableau 1).

Groupe	Régulation	Fonction
<i>cysPUWA</i>	Positive	Sulfate/thiosulfate transport
<i>cysM</i> ^(a)	Positive	O-Acetylserine (thiol)-lyase B
<i>cysK</i>	Positive	O-Acetylserine (thiol)-lyase A
<i>cysDNC</i>	Positive	Sulfate → PAPS
<i>cysJIH</i>	Positive	PAPS → sulfide
<i>cysE</i>	None	O-Acetyl-L-serine biosynthesis
<i>cysB</i>	Negative	Transcription activator
<i>fliY</i>	Positive	L-Cystine binding protein
<i>Sbp</i>	Positive	Sulfate binding protein
<i>yBiK</i> ^(b)	Positive	Glutathione uptake
<i>dcyD</i> ^(b)	Positive	D-Cysteine desulfhydrase
<i>Cblc</i>	Positive	Transcription activator for tauA and ssuE
<i>tauABCD</i> ^(b)	Positive	Taurine uptake and reduction
<i>ssuEADCB</i> ^(b)	Positive	Alkalesulfonate uptake and reduction
— ^(c)	Positive	L-Cystine transport system CTS-1

(a) *CysM* peut être co-transcrit avec l'opéron *cysPUWA*

(b) Non présent ou identifié chez *Salmonella typhimurium*

(c) —, le système de transport de L-Cystine CTS-1 n'a pas été décrit chez *E. coli*, et ses gènes chez *S. typhimurium* n'ont pas été identifiés.

Tableau 1 : Unités de transcription du régulon cystéine chez *E. coli* (modifié de Kredich et al., 2008).

De plus, il a aussi été montré chez ces bactéries que *CysB* va s'autoréguler négativement en allant également se fixer sur le promoteur de son propre gène *cysB*, inhibant sa transcription^{22,23}. La sulfhydrylation de l'OAS est ainsi régulée au niveau génétique via l'expression des deux isoenzymes cystéine synthases, qui se trouvent sous le contrôle positif du double régulateur transcriptionnel *CysB*. Enfin, contrairement à l'OAS, le H₂S et le thiosulfate jouent quant à eux le rôle d'anti-inducteurs^{24,25}.

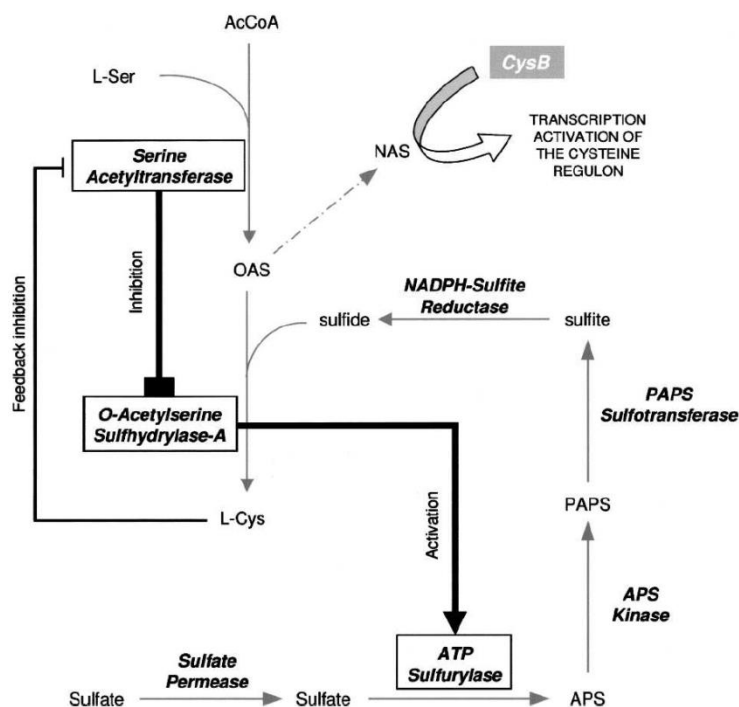


Figure 6 : Régulation de la voie de biosynthèse de la L-cystéine (issu de Campanini et al., 2005).

- **CysE/CysK et le complexe cystéine synthase**

Un autre mécanisme de régulation passe via la formation d'un complexe entre CysK et la L-sérine acétyltransférase CysE.

Chez certaines bactéries et les plantes supérieures, CysE et la cystéine synthase peuvent former un complexe enzymatique hétéromérique nommé CSC (pour « Cystein Synthase Complex »)^{26,27}. Contrairement à ce que l'on peut rencontrer parfois, où la formation d'un complexe d'enzymes participant à une même voie permet un couplage entre les enzymes de la même voie (« channeling » en anglais), ici la formation ou non du complexe est l'élément clé de la régulation. La formation du CSC est rendue possible grâce à l'ancrage d'une queue peptidique en C-ter de CysE (~10 acides aminés) dans le site actif de l'OASS CysK^{28,29}, gênant ainsi l'entrée de l'O-acétyl-L-sérine (OAS). Par exemple chez *Arabidopsis thaliana*, lorsque le complexe SAT-OASS est formé, l'activité SAT est plus élevée tandis que l'activité OASS est diminuée (en comparaison des formes libres de chacune des deux enzymes). Toujours chez *A. thaliana*, lorsque le complexe se dissocie, la SAT devient inactive et l'OASS redevient active. Chez les bactéries, ces résultats sont cependant à nuancer : en effet l'activité SAT mesurée lorsque le CSC est formé chez *E. coli* s'est révélée semblable à celle mesurée pour l'enzyme libre²⁹. Néanmoins, la formation du complexe est régulée par la concentration d'OAS et de H₂S : l'OAS déclenche la dissociation du complexe tandis que l'H₂S contrecarre l'effet de l'OAS. Cela signifie que la stabilité du complexe dépend de la disponibilité du soufre. Ainsi lorsqu'il y a trop d'OAS par rapport au H₂S, la forme dissociée du CSC permet d'éviter l'accumulation de cet OAS, la SAT étant moins active sous sa forme libre tandis que la CS est alors plus active.

La formation du CSC n'a cependant pas été observée avec l'isoenzyme CysM, par ailleurs moins fréquente dans les génomes que CysK²⁷. L'interaction CysE-CysK semble relativement conservée chez les bactéries ; de plus, comme l'ont montré Campanini et al. via un alignement de séquences des extrémités C-ter de CysE de divers organismes, les SAT testées présentent un haut degré de variabilité dans leur extrémité C-terminale (C-ter) mais possèdent invariablement une isoleucine (Ile) en dernière position (figure 7)²⁷.

	1	10
EcCysE	NHTFEYGDG	I
StCysE	HHTFEYGDG	I
HiCysE	GIDDGMLNI	I
NmCysE	IQFTEIDFM	I
YpCysE	IQGFYEGDG	I
BaCysE	VMDQMLGDG	I
MtCysE	GIWHGEDFS	I
SaCysE	NGEIQDDYI	I
BsCysE	EDRKERINQ	K
AtCysE	YLTEWSDYV	I
OsCysE	FIQQWSDYS	I
consensus>50 e . d . . i	

Figure 7 : Comparaison des extrémités C-ter (décapeptides) des SAT CysE de différents organismes. Pour les protéobactéries : *Escherichia coli* (EcCysE) ; *Salmonella typhimurium* (StCysE) ; *Haemophilus influenzae* (HiCysE) ; *Neisseria meningitidis* (NmCysE) ; *Yersinia pestis* (YpCysE) ; *Brucella abortus* (BaCysE) ; *Mycobacterium tuberculosis* (MtCysE). Pour les bactéries Gram-positives : *Staphylococcus aureus* ; *Bacillus subtilis* (BsCysE). Pour les plantes : *Arabidopsis thaliana* (AtCysE) ; *Oryza sativa* (OsCysE). Scores de similarité calculés à l'aide du programme ESPrIt ; score minimal de résidus équivalents = 0,7 (issu de Campanini et al., 2015).

À ce jour, aucune structure cristallographique du CSC n'est disponible, mais une structure 3D de la CysK d'*Haemophilus influenzae* (HiCysK ; Uniprot ID : P45040) avec un décapeptide mimant la partie C-ter de CysE du même organisme (HiCysE ; Uniprot ID : P43886) a été obtenue²⁸. La carte de densité électronique élaborée à partir de ce complexe a montré que seuls les quatre derniers résidus (P1 à P4) de ce décapeptide mimant la queue de CysE de *H. influenzae* étaient détectables dans le site actif de CysK. Des expériences de mutagenèse dirigée et de délétion à divers endroits de ce térapeptide ont montré que le résidu Ile en P4 est fondamental pour l'interaction CysE/CysK³⁰. En effet, la modélisation énergétique de l'interaction de HiCysE avec HiCysK montre que le résidu Ile (P4) représente environ 80 % de l'énergie totale de liaison³¹. Le docking *in silico* d'une librairie virtuelle d'une centaine de peptides de formule générale MNX1X2I dans le site actif de HiCysK effectué par Zhu et al. suggère qu'une forte affinité de liaison est associée à un résidu aromatique (F, Y ou W) en P2 (X1) et à un fort donneur de liaison hydrogène en P3 (X2)³². À noter néanmoins que les CysE des protéobactéries n'ont pas de résidu aromatique en P2 (X1) tandis que les autres protéines partenaires de CysK présentent un résidu Tyr, Phe ou His à cette position.

Ce mode d'interaction avec la queue C-ter d'une protéine partenaire est commun aux différentes fonctions qu'exerce en fait CysK, qualifiée par Campanini et al. de « moonlighting

protein »²⁷, c.-à-d. une protéine exerçant différentes fonctions selon son partenaire de liaison²⁷. À chaque fois, l'interaction avec sa protéine partenaire inhibe l'activité de CysK, ce qui implique une inter-dépendance des activités « moonlighting » due à une compétition entre partenaires, ce qui peut expliquer par exemple que la biosynthèse de la L-cystéine soit étroitement liée à la formation de biofilm chez *E. coli*²⁷. Chez *Bacillus subtilis*, l'inhibiteur de transcription CymR (Uniprot ID : O34527), régulateur de la famille Rrf2 et équivalent fonctionnel de CysB d'*E. coli*, est répresseur du régulon cystéine et forme également un complexe avec CysK³³ (figure 8). La stabilité de ce complexe dépend, comme pour le CSC, de la concentration en OAS : en condition de raréfaction de sulfate, l'OAS s'accumule dans la cellule et déstabilise le complexe qui se sépare, activant CysK, et dérégulant l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la cystéine. À l'inverse, en présence de sulfate, la concentration intracellulaire en OAS diminue, favorisant la formation du complexe CysK/CysE inhibant CysK et réprimant l'expression des gènes du régulon « cys »^{33,34}.

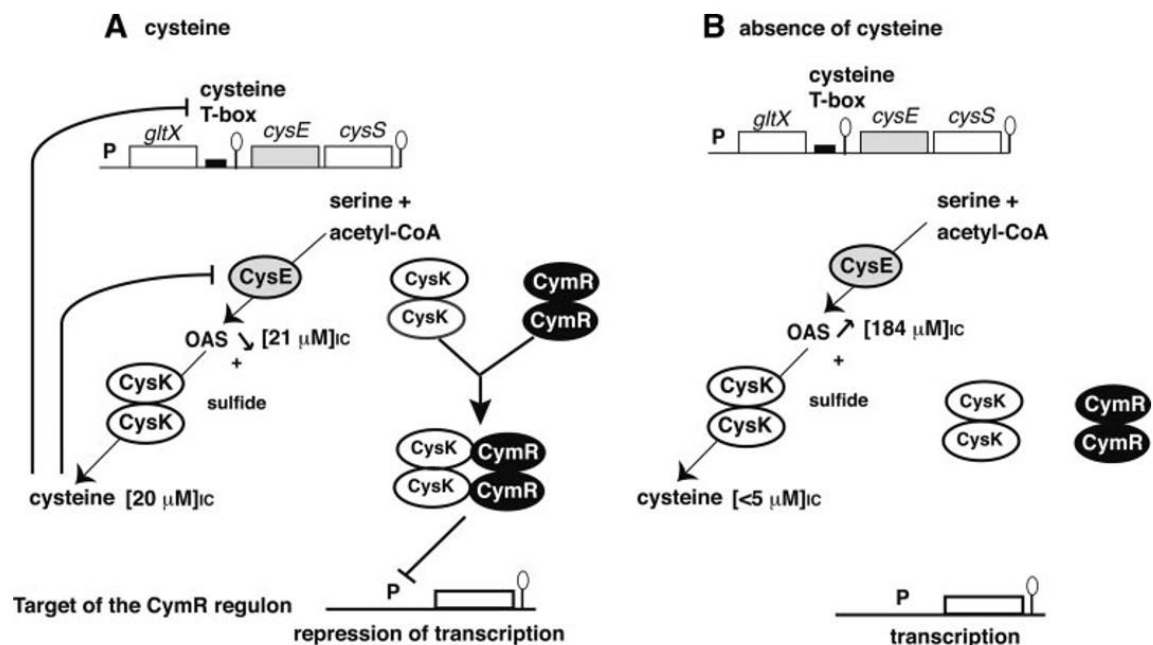


Figure 8 : Modèle de régulation de la biosynthèse de la L-cystéine chez *Bacillus subtilis* en présence de cystéine (panel A) ou en condition de raréfaction de cystéine (panel B) (issu de Tanous et al., 2008).

La présence du résidu Ile en P4 semble essentielle mais pas suffisante à la formation du CSC ; celui-ci peut en effet ne pas se former malgré sa présence, soit parce que l'extrémité C-ter de CysE n'est pas adaptée au site actif, soit parce que l'entrée du site actif de CysK n'est pas adaptée à son insertion, ou les deux. Par exemple chez l'amibe *Entamoeba histolytica*, le CSC est plutôt instable et ne se forme pas en conditions physiologiques à cause de résidus peu adaptés en C-ter de CysE ; Kumar et al. ont toutefois sensiblement amélioré l'affinité de EhCysE pour EhCysK en mutant les résidus Ser et Pro en P1 et P2 par les résidus Asp et Trp respectivement³⁵. Tandis que chez *Brucella abortus*, l'OAS n'interagit pas avec l'extrémité C-ter de sa SAT notamment en raison de la présence des résidus Gln96 et Tyr125 qui occupent la poche du site actif de BaCysK et interfèrent avec l'entrée de la queue C-ter de BaCysE³⁶.

1.1.2 Biosynthèse ARNt-dépendante de la cystéine, voie alternative

L'analyse des génomes d'archées a généralement échoué à montrer la présence de gènes codant pour l'une des quelconques enzymes établies dans les voies connues de biosynthèse de la L-cystéine. Le métabolisme de la cystéine a en outre été étudié chez l'archée thermophile extrême *Methanocaldococcus jannaschii*. White et al. ont remarqué que la 3-phospho-L-sérine (Sep), précurseur de la L-sérine, était un intermédiaire important dans la biosynthèse de la cystéine chez *M. jannaschii*³⁷. Une voie de biosynthèse de la Sep chez les archées a ensuite été caractérisée, et il s'est avéré que cette seule voie pouvait fournir une quantité suffisante de Sep pour à la fois la formation de sérine, de cystathionine et de cystéine³⁸. Des études biochimiques et des analyses génétiques ont finalement révélé que les organismes qui ne possèdent pas les gènes *cysE* ou *cysK* utilisent une voie ARNt-dépendante pour fournir des ARN de transfert (ARNt) L-cystéinyl-[ARNt^{Cys}] à la traduction ribosomique ainsi que pour la biosynthèse de L-cystéine libre³⁹. Ce processus couple ainsi la synthèse des protéines avec la production de cystéine et est principalement observé dans un grand sous-ensemble d'Euryarchées⁴⁰. Par ailleurs, cette voie indirecte coexiste chez de nombreuses espèces avec la voie de charge directe de l'ARNt^{Cys} avec la L-cystéine, qui est catalysée par la cystéine-ARNt ligase (Cys-RS)⁴⁰.

La voie de biosynthèse de la L-cystéine dépendante des ARNt se déroule en deux étapes (figure 9). Dans la première, l'ARNt^{Cys} non chargé est aminoacylé avec la Sep par l'O-phosphoséryl-ARNt ligase (Sep-RS), formant l'O-phospho-L-séryl-[ARNt^{Cys}]. Une seconde enzyme, la 3PS-ARNt: Cys-ARNt synthase (SepCysS), transforme ensuite la partie Sep en cystéine, toujours liée à l'ARNt. Pour cette seconde étape, le H₂S s'est avéré être un donneur de soufre suffisant *in vitro*, mais la nature du donneur de soufre *in vivo* n'a pas encore été étudiée⁴¹.

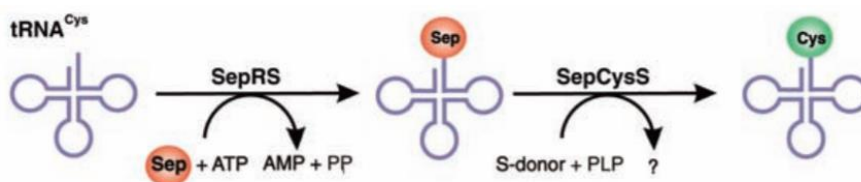


Figure 9 : Schéma de synthèse de L-cystéinyl-[ARNt^{Cys}] chez les archées méthanogènes. Sep : 3-phospho-L-sérine ; SepRS : O-phosphoséryl-tRNA synthase ; SepCys : Sep-tRNA:CystRNA synthase (issu de Sauerwald et al., 2005).

SepRS et SepCysS forment en réalité un complexe ternaire stable avec SepCysE, une protéine d'échafaudage qui favorise la conversion de l'intermédiaire O-phospho-L-séryl-[ARNt^{Cys}] en L-cystéinyl-[ARNt^{Cys}] et sa séquestration en empêchant sa liaison au facteur d'élongation EF-1 α et son insertion dans le ribosome^{42,43}. Alors que SepCysE était pensé comme étant présent uniquement chez les euryarchées méthanogènes de classe I, des homologues ont été trouvés chez certains archées des groupes TACK et Asgard, mais également des homologues tronqués génétiquement fusionnés ou couplés chez des espèces contenant SepCysS. Enfin, il a été montré *in vitro* que cette voie alternative existe aussi probablement *in vivo* chez quelques Δ -protéobactéries et les Chloroflexi⁴³.

1.2 Voies de biosynthèse de la méthionine

Contrairement aux mammifères qui ne possèdent pas la capacité de synthétiser la L-méthionine, la plupart des espèces bactériennes possèdent l'intégralité des voies de biosynthèse de la méthionine. Parmi les exceptions, on retrouve notamment des espèces endosymbiotiques au génome réduit, comme la bactérie *Wolbachia*, qui infecte principalement les arthropodes^{44,45}.

De manière générale, la L-méthionine est synthétisée à partir de la L-homosérine, qui elle-même provient du L-aspartate dont le groupement carboxyle est réduit en deux étapes successives après sa phosphorylation par une aspartate kinase. Chez *Escherichia coli*, où les voies de biosynthèse de la L-méthionine sont les plus étudiées, trois aspartate kinases (APK) isofonctionnelles effectuent cette réaction : LysC (APK III), ThrA et MetL (APK I et II respectivement). Ces deux dernières sont deux protéines bifonctionnelles catalysant également la réaction de conversion du L-aspartate semialdéhyde en L-homosérine (figure 10). La première réduction du L-aspartyl-phosphate se fait ainsi via l'intermédiaire d'une aspartate semialdéhyde déshydrogénase (Asd chez *E. coli*) et la seconde via une homosérine déshydrogénase (MetL ou ThrA).^{46,47} Deux autres gènes intervenant dans la phosphorylation de l'aspartate ont été identifiés : le premier est un autre gène de bactérie, *ycfM* (Uniprot ID : P94417), que l'on retrouve chez *Bacillus subtilis* et qui code pour une APK de type III^{48,49} ; le second est le gène MJ0571 (Uniprot ID : Q57991), qui a été décrit chez l'archée *Methanocaldococcus jannaschii*⁵⁰, et qui s'avère être un homologue à l'APK III monofonctionnelle que l'on trouve chez les bactéries.

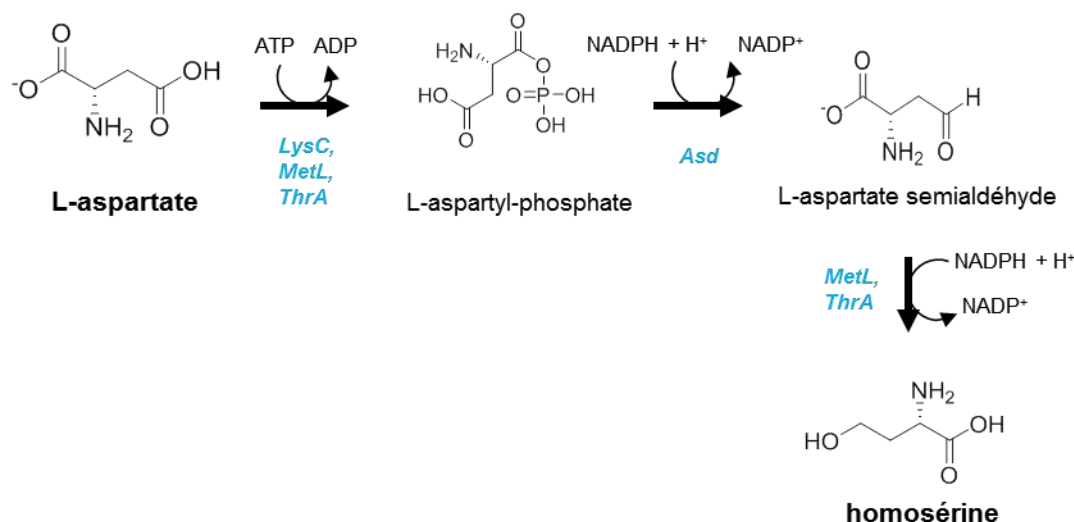


Figure 10 : Voie de biosynthèse de la L-homosérine à partir du L-aspartate chez *E. coli*

La biosynthèse de la méthionine est étroitement régulée, que ce soit au niveau de l'expression génique ou au niveau de l'activité enzymatique. Ces mécanismes régulateurs sont, comme pour la L-cystéine, également étroitement liés à l'assimilation du soufre⁵¹. La méthionine, qui appartient donc à la famille des acides aminés issus de l'aspartate (également précurseur de la thréonine, de la lysine et de l'isoleucine), voit sa biosynthèse par conséquent aussi contrôlée en partie par d'autres produits de cette voie, y compris la lysine issue du L-aspartate semi-aldéhyde et la thréonine issue de la L-homosérine. L'APK, l'enzyme qui catalyse la conversion initiale de l'aspartate en L-aspartyl-phosphate

(figure 10 ci-dessus), joue ainsi un rôle important dans le contrôle de la biosynthèse globale des acides aminés de la famille aspartate. Les espèces bactériennes ayant de multiples isoenzymes APK, chacune possède une régulation différentielle de son activité catalytique et de son niveau d'expression génique par les acides aminés produits *in fine*⁵². L'homosérine, qui découle de cette voie, représente par ailleurs une étape déterminante dans l'engagement de la biosynthèse de la méthionine, avec de multiples modes de régulation supplémentaires identifiés pour contrôler le taux de méthionine⁵³.

La mécanique biochimique logique (et vraisemblablement la plus courte) pour synthétiser la L-méthionine à partir de la L-homosérine consiste à activer l'homosérine par acylation de son groupement hydroxyle, puis à remplacer cet acyle par un groupement thiol pour former la L-homocystéine. Cette voie est appelée voie de sulfhydrylation directe. La seconde voie la plus classique, décrite dès les années 1960s chez *E. coli* par Rowbury & Woods⁵⁴, permet quant à elle de synthétiser l'intermédiaire L-homocystéine d'une autre manière. Celle-ci consiste en effet à transsulfurer la L-homosérine activée par succinylation ; puis ensuite à hydrolyser la cystathionine formée pour donner de la L-homocystéine (figure 11). Cette voie est appelée voie de transsulfuration. Ces deux voies seront décrites plus en détail dans ce chapitre. La dernière étape, dans ces deux voies, est le transfert d'un groupement méthyle sur la fonction thiol de la L-homocystéine pour finaliser la synthèse de la méthionine.

Cependant, le nombre croissant d'études sur des bactéries de plus en plus diverses, ainsi que la progression rapide du nombre de génomes complets connus de ces organismes, montrent qu'il existe d'autres alternatives et potentiellement d'autres intermédiaires aux voies déjà décrites. Si bien qu'il semble évident que la voie de biosynthèse de la méthionine telle qu'elle est décrite chez *E. coli* soit loin d'être la plus couramment fonctionnelle. Comme l'ont exprimé Ferla et Patrick dans leur revue sur la biosynthèse bactérienne de la méthionine⁵⁵, elle reste malgré tout une base utile pour la comparaison avec d'autres voies plus communes de biosynthèse de la méthionine chez d'autres procaryotes.

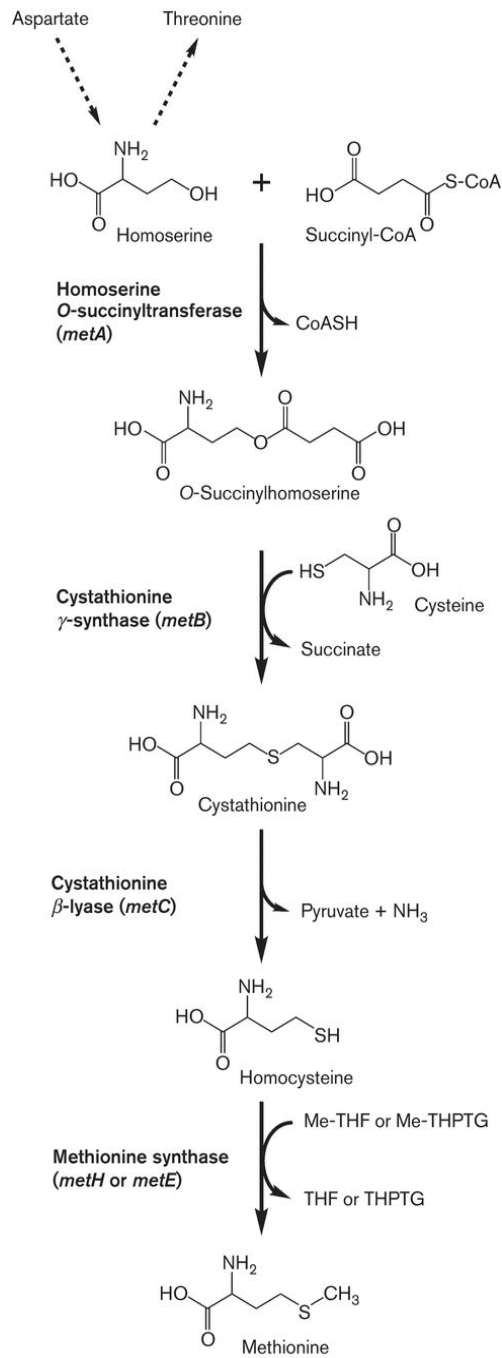


Figure 11 : Voie de biosynthèse de la méthionine chez *E. coli*.
 Me-THF = 5-méthyl-tétrahydrofolate ; Me-THPG = 5-méthyltétrahydropteroyl tri-L-glutamate ; THF, tétrahydrofolate ; THPTG = tétrahydropteroyl tri-L-glutamate (issu de Ferla et Patrick, 2014).

1.2.1 Acylation de la L-homosérine

Chez les bactéries mais aussi chez les champignons, l'activation de l'homosérine par acylation via une homosérine *O*-acyltransférase peut se faire :

- soit par le transfert d'un groupement *O*-succinyl (provenant du cofacteur succinyl-CoA), comme c'est le cas avec l'enzyme MetA d'*E. coli*^{56,57} ;
- soit d'un groupement *O*-acétyl (provenant du cofacteur acétyl-CoA) comme c'est le cas avec l'enzyme MetX de *Leptospira meyeri*⁵⁸ ou avec son homologue chez les champignons (Met2 chez *Saccharomyces cerevisiae*⁵⁹ et Met5 chez *Neurospora crassa*⁶⁰).

Ces deux familles d'enzymes encodées par les gènes *metX* et *metA* n'ont aucune homologie de séquence ni de structure ; en outre en 2005, Gophna et al. ont émis l'hypothèse que ces deux familles ont évolué de manière indépendante⁶¹. Cependant, ces deux familles utilisent le même mécanisme enzymatique : l'acyl R-CO- (succinyl ou acétyl) est transféré via un mécanisme enzymatique ping-pong dans lequel la première moitié de réaction est une substitution du groupement CoA de l'acyl-CoA par un résidu cystéine de la poche catalytique de l'enzyme et conduisant à la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme. Ceci est dans un second temps suivi par le transfert du groupement acyl de l'enzyme vers l'homosérine, permettant ainsi la formation de l'*O*-acylhomosérine (figure 12).

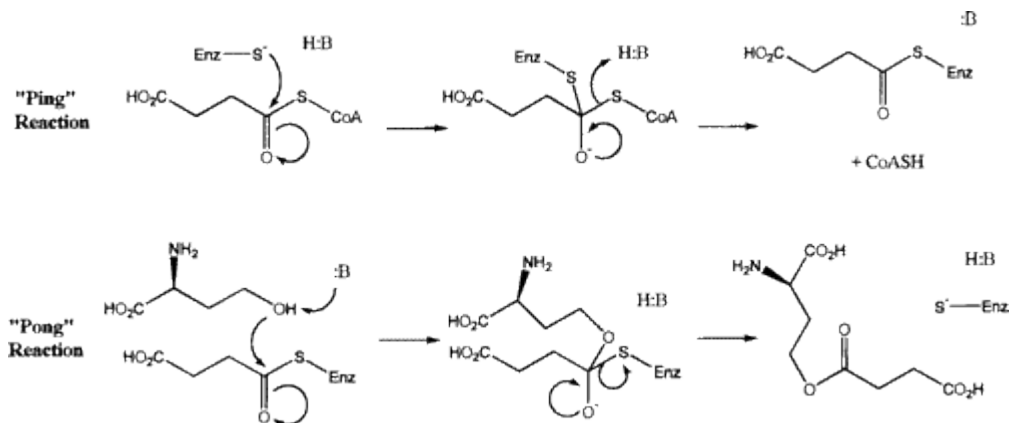


Figure 12 : Mécanisme proposé par Born et Blanchard (1999) pour le transfert de succinate à partir de succinyl-CoA vers l'homosérine, réaction catalysée par l'homosérine *O*-succinyltransférase.

Suite aux différentes études de l'enzyme MetA d'*E. coli*, une homosérine *O*-succinyltransférase (HST), il fut généralisé que tous les homologues au gène *metA* encodent pour des HST, et que tous les homologues au gène *metX* encodent pour des homosérine *O*-acétyltransférases (HAT). Ainsi jusqu'en 2017, date à laquelle le laboratoire a publié une vaste étude systématique sur ces deux familles (Bastard & Perret et al., 2017)⁶², c'est suivant cette règle par homologie de séquence que ces enzymes étaient annotées dans les bases de données classiques telles que Genbank ou UniprotKB. Pourtant, il y a une dizaine d'années, quelques publications avaient montré expérimentalement que des enzymes MetA contredisaient cette annotation automatique : c'est le cas des MetA de *Thermotoga maritima*⁶³, *Bacillus cereus*⁶⁴ ou encore *Agrobacterium tumefaciens*⁶⁵, qui ont toutes été expérimentalement validées sur enzymes purifiées comme étant des enzymes HAT et non des HST.

D'ailleurs, cette information avait déjà été suggérée dès les années 1970s sur deux espèces de *Bacillus*, chez qui l'activité HAT avait été détectée sur lysat cellulaire (Brush & Paulus en 1971⁶⁶, Wyman et Paulus en 1975⁶⁷) mais avait été ensuite oubliée jusqu'en 2007 (Ziegler et al.⁶⁴). Malgré ces articles, l'annotation n'a pas été répercutée dans les bases de données, laissant proliférer l'erreur d'attribution de fonction jusqu'en 2017 (Bastard & Perret et al.⁶²). Quant à la famille des MetX, le faible nombre de résultats expérimentaux semblaient suggérer une utilisation exclusive de l'acétyl-CoA^{68,69}. Une seule exception dans la littérature jusqu'alors : le gène *metX* de *Pseudomonas aeruginosa* (souche PAO1), bactérie pour laquelle des tests enzymatiques sur lysats bruts ont démontré une activité HST⁷⁰ et non HAT comme cela était attendu pour une MetX. Cependant, deux articles sur d'autres espèces de *Pseudomonas* attribuaient la fonction HAT à leurs MetX (Andersen et al. en 1998⁷¹, Alaminos & Ramos en 2001⁷²) concluant à l'exception de *P. aeruginosa* sans autres investigations. Par ailleurs en 2008, de Berardinis et al. ont observé que le gène *metA* d'*E. coli* (*metA_{coli}*) permettait de lever l'auxotrophie à la méthionine du mutant $\Delta metX$ d'*ADP1*⁷³ suggérant que MetX_{ADP1} et MetA_{coli} étaient isofonctionnelles. La caractérisation biochimique au laboratoire de MetX_{ADP1} a alors permis de démontrer son activité HST. Confiant dans les données expérimentales de Foglino et al. sur *P. aeruginosa*⁷⁰, les activités des MetX de *P. syringae* et de *P. putida* ont été testées au laboratoire, et il a été démontré avant mon arrivée que ces quatre MetX étaient en effet toutes des HST codées par des gènes *metX* comme l'enzyme d'*E. coli*, codée quant à elle par le gène *metA*. Ces résultats ont ainsi levé des doutes quant à la pertinence et les limites de la méthode d'annotation de ces deux familles d'enzymes. Pour simplifier la lecture par la suite, je noterai MetX-HAT les enzymes codées par un gène *metX* mais qui ont une activité HAT et MetX-HST celles qui ont une activité HST. Il en sera de même pour les enzymes MetA.

En analysant la structure cristallographique de l'enzyme MetA de *B. cereus*, prédite HST mais caractérisée HAT (Ziegler et al.⁶⁴), Zubetia et al. ont révélé en 2008 la présence dans le site actif d'un résidu clef permettant de déterminer la spécificité de prise en charge d'acyl-CoA par l'enzyme⁷⁴. En effet, ils ont montré que muter le résidu Glu111 par une glycine suffisait à modifier la préférence de l'enzyme pour le succinyl-CoA, la rendant ainsi HST. Une analyse basée uniquement sur la présence du résidu glycine ou glutamate à cette position clef du site actif sur plus de 900 espèces bactériennes possédant le gène *metA* et appartenant à différentes classes a montré que 60 % des enzymes codées par ce gène avaient un résidu glutamate à cette position, suggérant une activité HAT (MetA-HAT), et 20% seulement un résidu glycine et une activité HST (MetA-HST) tel que prédit par l'annotation. Cela soulignait par ailleurs que cette activité s'avère très fréquente chez les γ -protéobactéries⁵⁵. Les 20% restant d'enzymes MetA de leur analyse ne contenaient cependant ni glutamate ni glycine à cette position 111, empêchant une assignation fonctionnelle automatique et précise.

Cette particularité de la famille MetA a conduit les chercheurs de mon laboratoire à se poser la question suivante : y aurait-il également un ou des résidus responsables de la spécificité de l'acyl-CoA dans les sites actifs de la famille MetX ? Ainsi, afin de comprendre les déterminants structuraux responsables de la spécificité de l'acyl-CoA de ces deux familles d'enzymes isofonctionnelles et non homologues que sont MetA et MetX⁷⁵, des analyses fonctionnelles et structurales à grande échelle ont été menées au laboratoire. Pour cela, la caractérisation expérimentale de l'activité L-homosérine O-acyltransférase provenant d'une centaine de MetX et MetA représentatives de la biodiversité a été entreprise afin d'estimer l'étendue des deux fonctions dans chaque famille. Parallèlement, une étude de la diversité des sites actifs présents dans ces deux familles a été entreprise. Pour cela, une analyse structurale basée sur la modélisation des sites actifs de ces enzymes (par homologie avec des

structures cristallisées) et sur leur classification a été menée⁷⁶ (application de la méthode ASMC pour « Active Sites Modeling & clustering », méthode développée au Genoscope par Mélo-Minardi et ses collaborateurs en 2010 - figure 13). Les données expérimentales ont ensuite été superposées à l'arbre du clustering hiérarchique des sites actifs. Le classement des sites actifs selon leur similarité a permis d'observer des éléments déterminants comme la conservation ou non de l'emplacement de certains résidus dans ces sites actifs. De plus, des données simulant l'étape acyl-enzyme de la réaction de transacylation ont été collectées en réalisant le docking *in silico* de la L-homosérine et/ou de l'acyl-CoA (notamment pour les MetX, dont aucune n'a encore été co-cristallisée avec son substrat). Cela leur a ainsi permis d'identifier des positions critiques, ou logos, qui correspondent à des résidus conservés responsables de la spécificité de l'acyl-CoA dans les sites actifs des enzymes MetX et MetA.

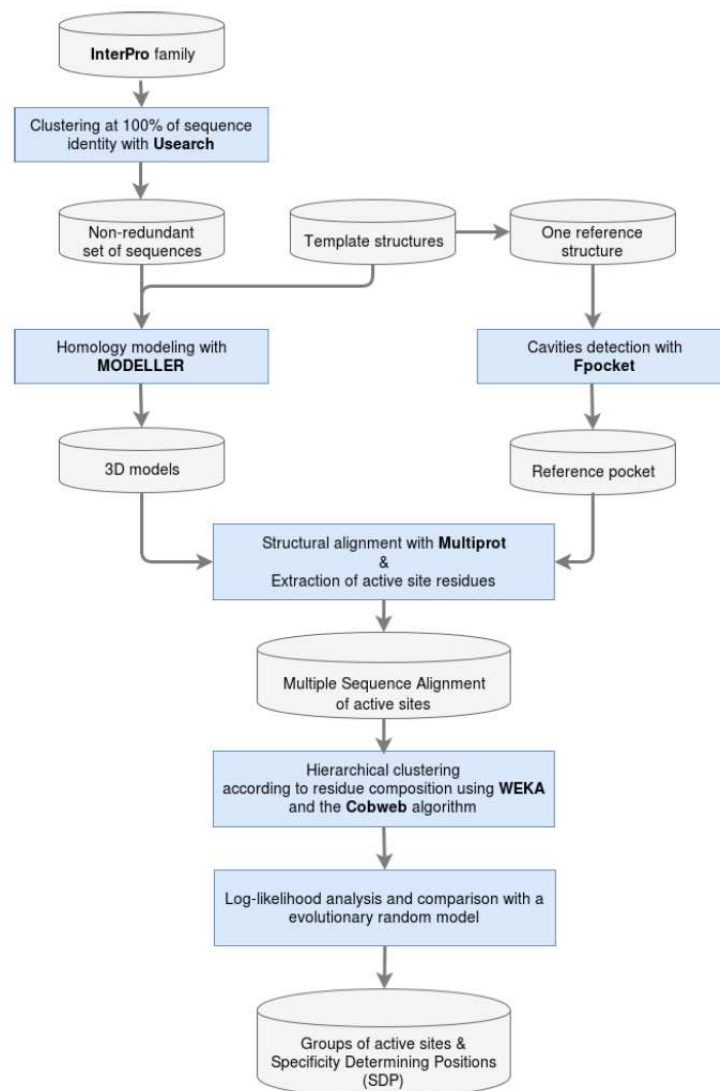


Figure 13 : Méthode ASMC de modélisation et clustering des sites actifs (issu de Bastard, Perret et al., 2017).

Compte tenu du fait qu'une partie de mon travail de thèse a été l'étude d'un sous-groupe issu de l'analyse ASMC de la famille MetX, une présentation détaillée des résultats de cette analyse va être abordée. Ainsi, pour les MetX, la classification de 4280 sites actifs générés par ASMC a donné lieu à la

formation de 4 groupes (figure 14) : les MetX ayant une activité HAT expérimentalement déterminée au laboratoire se sont retrouvées dans le groupe MetX-G1, alors que celles avec une activité HST sont dans les groupes MetX-G2 & G3. Un quatrième groupe, MetX-G4, rassemble des protéines pour lesquelles il n'avait pas été possible de mettre en évidence une activité homosérine acyltransférase. Pour ces quatre groupes, Karine Bastard (en charge de l'étude structurale) a pu identifier trois résidus conservés impliqués dans une triade catalytique : la sérine143 au logo P8 et l'histidine337 au logo P19, ainsi que l'aspartate304, enfoui dans le site actif de MetX_{influenzae} et sans logo. Les résidus arginine et aspartate, respectivement aux logos P12 et P20, sont conservés dans les groupes 1 à 3, c'est-à-dire ceux comprenant les enzymes avec activité, et permettent la liaison avec la L-homosérine. Deux positions déterminantes ont été identifiées pour la spécificité de l'acyl-CoA : il s'agit du résidu arginine en P11 ou P17 qui, en interagissant avec le groupe carboxylate du succinyl, est responsable de l'activité HST. Cela a été prouvé expérimentalement en effectuant le mutant Arg323Leu pour muter l'arginine en P11 de MetX-HST d'*A. baylyi* (groupe ASMC MetX-G2), qui est alors devenue HAT. À l'inverse, le mutant Leu306Arg de la MetX-HAT d'*H. influenzae* (groupe MetX-G1) est devenue HST. L'étude globale des sites actifs a ainsi révélé que l'utilisation de succinyl-CoA est contrainte par la présence du résidu chargé arginine en P11 ou P17 et qu'en l'absence de ce résidu les enzymes ont une activité HAT. Dans le groupe G1 des HAT, l'acétyl-CoA se positionne alors dans une région différente du site actif de celle recueillant le succinyl-CoA. Il a été formulé ainsi l'hypothèse que cet arrangement s'avèrerait être caractéristique de l'archétype des MetX-HAT, et que cette famille aurait évolué de deux manières distinctes pour basculer vers une préférence pour le succinyl-CoA (Bastard et al., 2017⁶²).

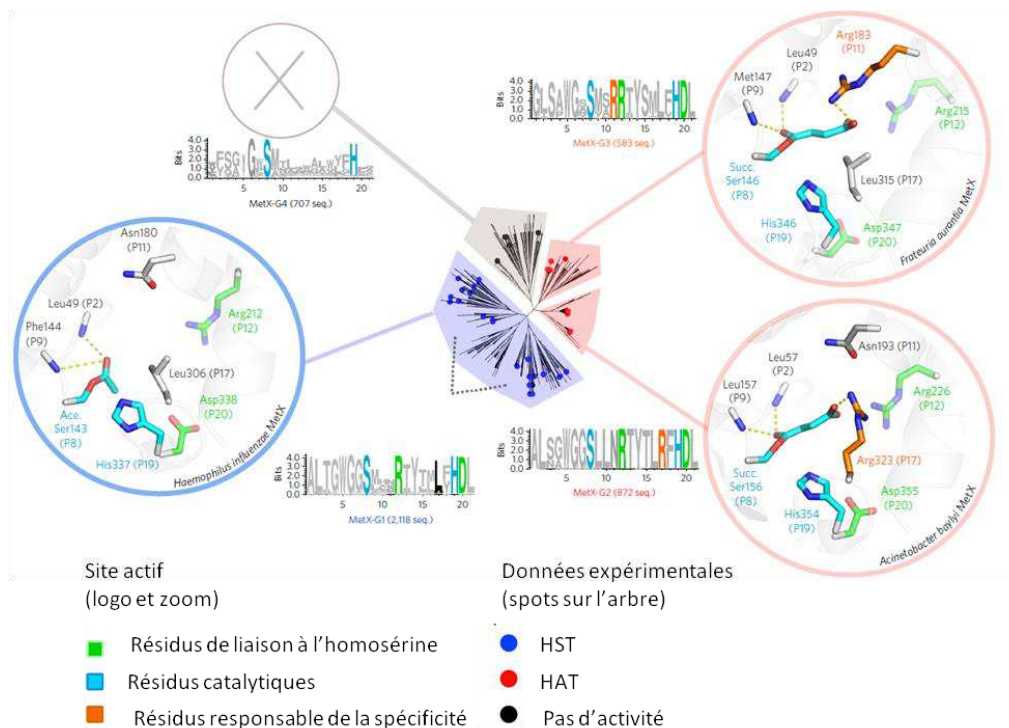


Figure 14 : Arbre de clustering hiérarchique des protéines MetX selon la similarité structurale de leur site actif. Le nombre de séquences (seq.) pour chaque groupe est indiqué sous le logo, qui représente la conservation des résidus du site actif. Les sites actifs sont affichés pour un membre de chaque groupe, avec le nom de la bactérie. Les lignes en pointillés indiquent les interactions électrostatiques (issu de Bastard, Perret et al., 2017).

Pour la classification des 2662 sites actifs de MetA générés par ASMC, 4 groupes ont également été obtenus, les HAT étant réparties dans les groupes ASMC MetA-G1 et G2, et les HST dans les groupes ASMC MetA-G2 et G3. Comme proposé précédemment par Zubetia et al., la présence en position P5 d'un résidu acide comme le glutamate permet de prévenir le positionnement du succinyl-CoA. Mon travail ayant été focalisé sur la famille MetX, je ne développerai pas l'analyse structurale de la famille MetA exposée dans Bastard, Perret et al., 2017. Cependant, et pour résumer, il ne semble pas exister d'archétype chez les MetA contrairement aux MetX, puisqu'une MetA-HAT nécessite forcément la présence d'un résidu acide en P5, tandis que chez les MetX c'est l'absence de logo particulier spécifique à l'acétyl-CoA qui entraîne *de facto* une activité HAT. Néanmoins, que ce soit pour les MetX ou les MetA, 2 groupes distincts non proches phylogénétiquement incluent les HST, suggérant que ces deux familles d'enzymes ont développé cette activité au sein de leur propre famille par le biais de deux voies indépendantes.

Tous ces éléments ont permis aux auteurs de proposer un arbre de décision pour régir l'annotation fonctionnelle des MetX et des MetA. En l'appliquant ensuite aux quelques 10000 séquences de ces familles d'enzyme actuellement dans les bases de données, ils ont pu prédire que plus de 60 % d'entre elles étaient incorrectement annotées dans UniprotKB et ont ainsi été ré-annotées. En effet, seulement 46 % des MetX ont une activité HAT et 31 % des MetA ont une activité HST (figure 15). En fait, la grande majorité des enzymes codées par *metA* utilisent l'acétyl-CoA comme les *Bacilli*, à la différence d'*E. coli*, pourtant bactérie modèle pour cette étape, qui est finalement plutôt une exception au sein de cette famille.

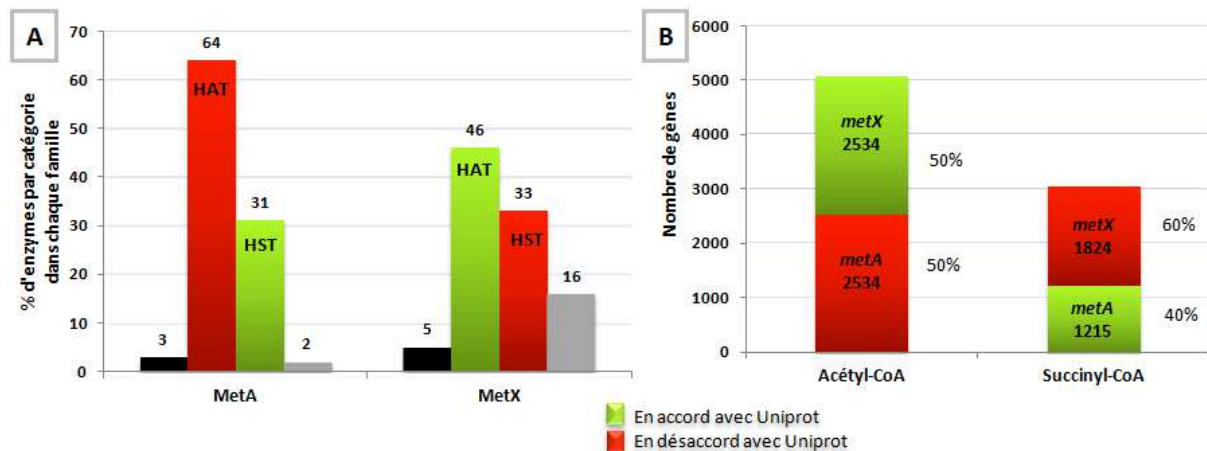


Figure 15 : Distribution de la prédiction de l'usage d'acyl-CoA dans les familles MetA et MetX. Les prédictions d'usage d'acyl-CoA sont en vert quand elles sont en accord avec l'annotation usuelle (avant 2017) et en rouge quand elles ne le sont pas. A. Distribution par famille des catégories : protéines non modélisées {noir}, protéines modélisées acétyl-CoA transférases (HAT) ou succinyl-CoA transférases (HST), protéines modélisées sans triade catalytique canonique {gris}. B. Distribution par activité.

Il a été proposé à Swissprot de préciser l'annotation de ces enzymes en modifiant le nom des protéines (figure 16) : une MetA-HAT est dorénavant annotée MetAA tandis qu'une MetA-HST sera annotée MetAS. De la même manière, le nom des MetX a été modifié en MetXA et MetXS suivant la préférence de l'acyl-CoA.

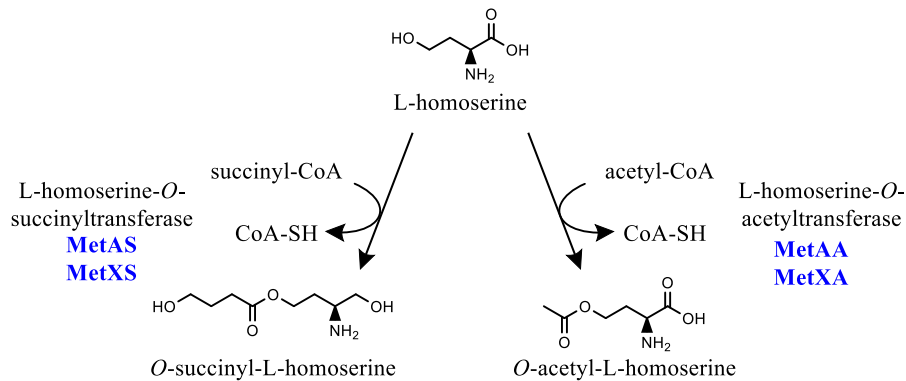


Figure 16 : Nouvelle annotation des enzymes MetX et MetA impliquées dans la voie de biosynthèse de la L-méthionine selon leur usage de l'acyl-CoA.

Plus globalement, on voit que l'activité acétyl-CoA transférase est la plus répandue quelle que soit la famille. Les prédictions d'activité ont été superposées sur le cladogramme de taxonomie du NCBI et les auteurs ont constaté que les MetX et les MetA ancestrales ont toutes deux une activité HAT. Cela laisse supposer que ces deux familles ont récemment évolué en parallèle vers l'activité HST chez les protéobactéries.

L'activité des enzymes MetA et MetX semblent différemment régulée : MetX paraît ainsi peu sensible à l'effet feedback négatif qui pourrait avoir lieu en présence de fortes concentrations en méthionine, comme observé avec MetA⁷⁷. Par ailleurs, certaines de ces enzymes semblent sensibles à la chaleur. Ainsi la MetAA de *Paenibacillus polymyxa* s'est avérée être inactivée en présence de températures élevées, subissant alors une protéolyse énergie-dépendante (phénomène également observé sur les MetA de trois Entérobactériacées : *E. coli*, *S. typhimurium* et *Klebsiella aerogenes*)⁷⁸⁻⁸⁰. Cette forte sensibilité et instabilité thermique peut servir à contrôler efficacement les taux de croissance cellulaire, en limitant la disponibilité de la méthionine, alors que celle-ci est nécessaire pour l'initiation et la poursuite de la synthèse protéique, la biosynthèse des purines et des polyamines et diverses réactions de méthylation. La présence de ce type de système de contrôle a d'ailleurs déjà été démontrée chez *E. coli*, où la disponibilité de la méthionine fournit un mécanisme de réponse sensible aux températures élevées⁸⁰. Cette observation suggère un rôle possible du produit du gène *metA* dans un système de régulation global de la croissance cellulaire, et donc dans le contrôle de la physiologie cellulaire⁵¹.

Une potentielle troisième voie d'activation de l'homosérine, présente chez les plantes, pourrait exister chez les bactéries comme le suggère l'analyse de Ferla et Patrick⁵⁵. Comme pour la méthionine, les auteurs expliquent que la voie de biosynthèse bactérienne de la thréonine commence également par l'homosérine. Celle-ci est alors activée par phosphorylation plutôt que par acylation ; cette étape est réalisée par l'homosérine kinase, codée par le gène *thrB*, et conduit à la formation de l'*O*-phosphohomosérine⁸¹ (figure 17). Les plantes utilisent en outre cette *O*-phosphohomosérine comme intermédiaire activé pour la biosynthèse de la thréonine comme chez les bactéries mais également pour celle de la méthionine⁸². À ce jour et à notre connaissance, aucune voie de biosynthèse de la méthionine passant par l'*O*-phosphohomosérine n'a été rapportée chez les bactéries ou les archées, mais les auteurs ont noté que le génome de *Haliangium ochraceum*, une protéobactérie, était

un potentiel candidat bactérien pour posséder la voie végétale. Son génome ne semble pas présenter de gènes *metA* ou *metX*⁸³, mais il possède *thrB* (Uniprot ID : D0LJ82) et un gène codant pour une cystathionine γ -synthase qui est un homologue proche de l'enzyme d'*Arabidopsis thaliana* (qui synthétise la cystathionine à partir de l'*O*-phosphohomoserine⁸⁴). Par conséquent, Ferla et Patrick suggèrent qu'il peut y avoir jusqu'à trois manières différentes par lesquelles des espèces bactériennes synthétisent des dérivés activés d'homoserine pour y incorporer ultérieurement du soufre.

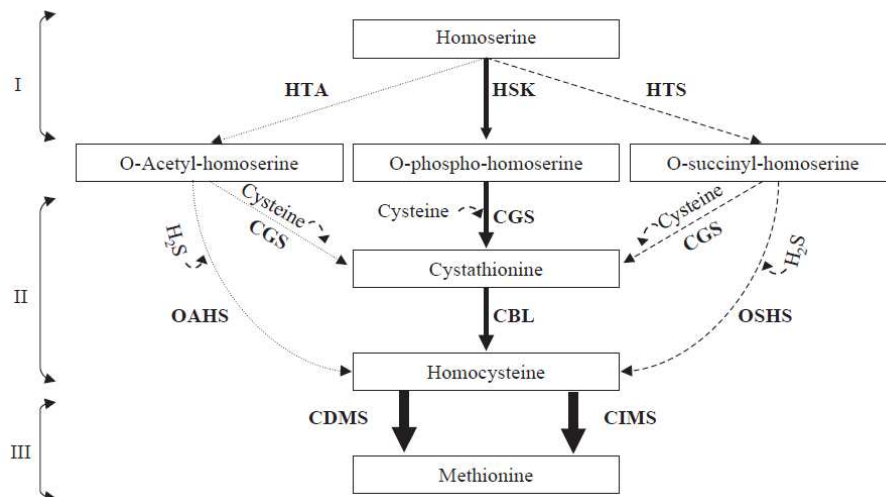


Figure 17 : Voies d'activation de l'homoserine. HTA : homoserine trans-acétylase; HSK : homoserine kinase; HTS : homoserine trans-succinylase; CGS : cystathionine γ -synthase; CBL : cystathionine β -lyase; OAHS : *O*-acétyl homoserine sulfhydrylase; OSHS : *O*-succinyl homoserine sulfhydrylase; CDMS : cobalamin-dépendant méthionine synthase; CIMS : cobalamin-indépendant méthionine synthase. I : Activation de l'homoserine, II : Incorporation du soufre, III : Méthylation (issu de Gophna et al., 2005).

Hacham et al. ont conclu en 2003 que l'utilisation d'un groupement acyl était ancestrale: des trois enzymes en aval testées (cystathionine γ -synthases), toutes avaient une activité vis-à-vis de l'*O*-succinylhomoserine mais seule celle d'*A. thaliana* pouvait accepter l'*O*-phosphohomoserine⁶⁹. En revanche, une autre étude de Gophna et al. a conclu en 2005 que l'explication la plus parcimonieuse était que l'enzyme primordiale était une homoserine kinase codée par le gène *thrB*⁶¹. Laquelle de ces différentes voies d'activation de l'homoserine était présente dans la voie primordiale pour la biosynthèse de la méthionine ? Il semble encore difficile de pouvoir y répondre avec certitude.

1.2.2 Biosynthèse de la L-homocystéine et voies d'incorporation du soufre

L'étape qui suit l'activation de la L-homoserine consiste à échanger son groupement hydroxyle acylé contre un groupement thiol pour former l'homocystéine, en une ou deux étapes selon le donneur de soufre. Dans les deux voies, la première étape est une réaction de γ -substitution (figure 18). Cette réaction est catalysée par une *O*-acyl-L-homoserine thiolase (soit MetZ ou MetY chez les *Pseudomonadales*, ou Met25 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*) pour former directement la L-homocystéine en incorporant le soufre du sulfure d'hydrogène dans le cas de la voie de sulfhydrylation directe, ou par une cystathionine γ -synthase (CGS) dans le cas de la voie de transsulfuration, en incorporant le soufre de la L-cystéine pour former dans un premier temps la cystathionine (CTT) (via

MetB chez *E. coli* K12⁸⁵, ou MetI chez *Bacillus subtilis*⁸⁶, enzyme qui possède par ailleurs également une activité *O*-acétyl-L-homosérine thiolase). Dans cette dernière voie, la CTT subit ensuite une réaction de β -substitution catalysée par MetC, une cystathionine β -lyase (CBL), aboutissant à la formation de L-homocystéine (figure 18).

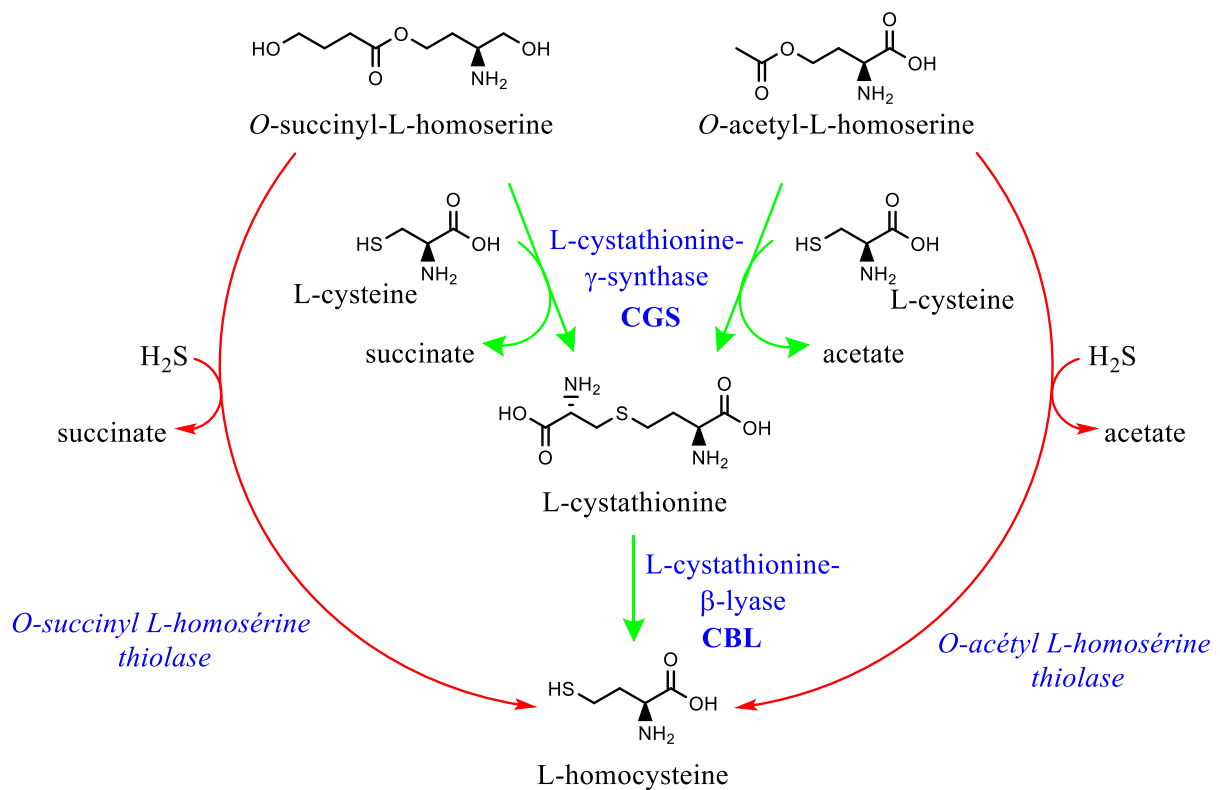


Figure 18 : Voies de biosynthèse de la L-homocystéine : voie de sulfhydrylation directe (rouge) et voie de transsulfuration (vert). Le schéma de la sulfhydrylation directe a été adapté selon les résultats obtenus par Bastard, Perret et al., 2017, car cette voie directe est prédite chez les *Pseudomonas* dont les MetXS synthétisent finalement de l'OSS et non de l'OAS comme décrit usuellement.

Ces deux voies, dans lesquelles on retrouve des enzymes qui utilisent le pyridoxal phosphate (PLP) comme co-facteur, au rôle clef dans l'assimilation du soufre, seront traitées indépendamment dans cette partie. Ces enzymes, reliées phylogénétiquement selon Catazaro et al.⁸⁷, partagent la même signature Interpro IPR000277 (« Cys/Met metabolism, pyridoxal phosphate-dependent enzyme ») et plusieurs paralogues de cette famille peuvent co-exister chez les organismes (figure 19). Ainsi, leur proximité en séquence et leur promiscuité de substrats *in vitro* rendent difficile, comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, leur assignation fonctionnelle correcte et un inventaire exhaustif.

- Cys/Met metabolism, pyridoxal phosphate-dependent enzyme (IPR000277)
- Cystathionine beta-lyase, bacterial (IPR006233)
- Cystathionine beta-lyase, eukaryotic (IPR006238)
- L-methionine gamma-lyase (IPR006237)
- O-acetylhomoserine/O-acetylserine sulfhydrylase (IPR006235)
- O-succinylhomoserine (thiol)-lyase (IPR011821)
- O-succinylhomoserine sulfhydrylase (IPR006234)
- Putative methionine gamma-lyase (IPR009651)

Figure 19 : « Généalogie » des familles Interpro ayant en commun le parent IPR000277 regroupant les enzymes à PLP impliquées dans le métabolisme de la cystéine/méthionine.

Enfin, nous verrons également qu'une troisième voie existe chez les archées pour biosynthétiser l'homocystéine, voie qui n'implique cependant ni la biosynthèse de l'homosérine ni celle de son intermédiaire acylé.

1.2.2.1 Voie de transsulfuration

La voie de transsulfuration permet dans un premier temps l'incorporation, dans l'homosérine acylée, du soufre de la fonction thiol de la L-cystéine, molécule à trois atomes de carbone. Cette réaction est catalysée par une cystathionine γ -synthase (CGS) qui chez *E. coli*⁸⁵ se nomme MetB et est parfois désignée par abus de langage comme une *O*-succinylhomosérine (thiol)-lyase (IPR011821), alors qu'il n'y a pas de voie de sulfhydrylation directe chez cette bactérie. Tandis que chez *Bacillus subtilis*, la synthèse de la CTT se fait via la CGS MetI (MetI_{subtilis}, Uniprot ID : O31631), qui présente, elle, une double activité et est ainsi à la fois CGS et *O*-acétylhomosérine (thiol)-lyase⁸⁶. Il est à noter qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de signature InterPro pour les *O*-acétylhomosérine (thiol)-lyases.

Dans un second temps, la L-cystathionine formée est convertie en L-homocystéine par une cystathionine β -lyase (CBL) : la fonction thiol se retrouve ainsi liée à un acide aminé à quatre atomes de carbone. Chez *E. coli* et d'autres bactéries entériques, seule la voie de transsulfuration est utilisée. L'homocystéine γ est ainsi synthétisée à partir de l'OSH en deux étapes catalysées par la CGS MetB (MetB_{coli}, Uniprot ID : P00935) et la CBL MetC (MetC_{coli}, Uniprot ID : P06721). Les cas d'activités CGS et/ou CBL décrits dans la littérature sont résumés en annexe 1.

- Les cystathionine γ -synthases (CGS)

Pour les CGS, il est parfois considéré que la spécificité pour le substrat L-homosérine activée est basée sur l'offre dans la cellule plutôt que sur la spécificité stricte de l'enzyme⁸⁸. Cette idée a été étayée par des données expérimentales montrant que les CGS peuvent accepter indifféremment l'*O*-succinyl-L-homosérine (OSH) ou l'*O*-acétyl-L-homosérine (OAH) comme substrats, les CGS de plantes étant les seules à pouvoir utiliser l'*O*-phospho-L-homosérine (OPH)⁶⁹. Pourtant, Kanzaki et ses collaborateurs, qui ont mesuré l'activité CGS sur des extraits cellulaires de 75 bactéries issues de 25 genres différents en 1986⁸⁹, ont montré qu'il existe plutôt en général une spécificité pour un des deux substrats *O*-acyl-L-homosérine, et ce bien que chez certaines rares bactéries, comme *Corynebacterium*, des activités similaires pour l'OAH ou l'OSH aient été mesurées (figure 20). Les CGS ont ainsi été classées en deux catégories selon leur préférence de substrat : type I pour celles qui utilisent l'OSH et

type II pour l'OAH. Kanzaki et al. en avaient ainsi conclu qu'en général, les bactéries Gram négatives utilisent l'OSH, alors que les Gram positives, l'OAH. Suite à l'analyse de Bastard & Perret et al., on se rend compte que la nature de l'acyl-coA ne dépend pas de cette catégorisation. On retrouve l'OAH aussi bien chez des bactéries Gram négatives (ex : *Agrobacterium tumefaciens*) que positives (ex : les Firmicutes), ce qui implique logiquement des CGS acceptant l'OAH. Par contre en effet, l'activité HST ne se rencontrant que chez les protéobactéries les plus récentes, seules des bactéries Gram négatives produisent de l'OSH, impliquant des CGS acceptant ce même OSH (ex : *Pseudomonas aeruginosa*). Depuis l'étude de Kanzaki et al., une dizaine de CGS seulement ont été biochimiquement caractérisées. Parmi elles, quatre enzymes MetB ont été expérimentalement décrites dans la littérature : celle de *Salmonella typhimurium*^{90,91}, celle d'*E. coli* K12⁸⁵, celle de *Helicobacter pylori*⁹² (autrefois *Campylobacter pylori*), et celle de *Mycobacterium tuberculosis*⁹³.

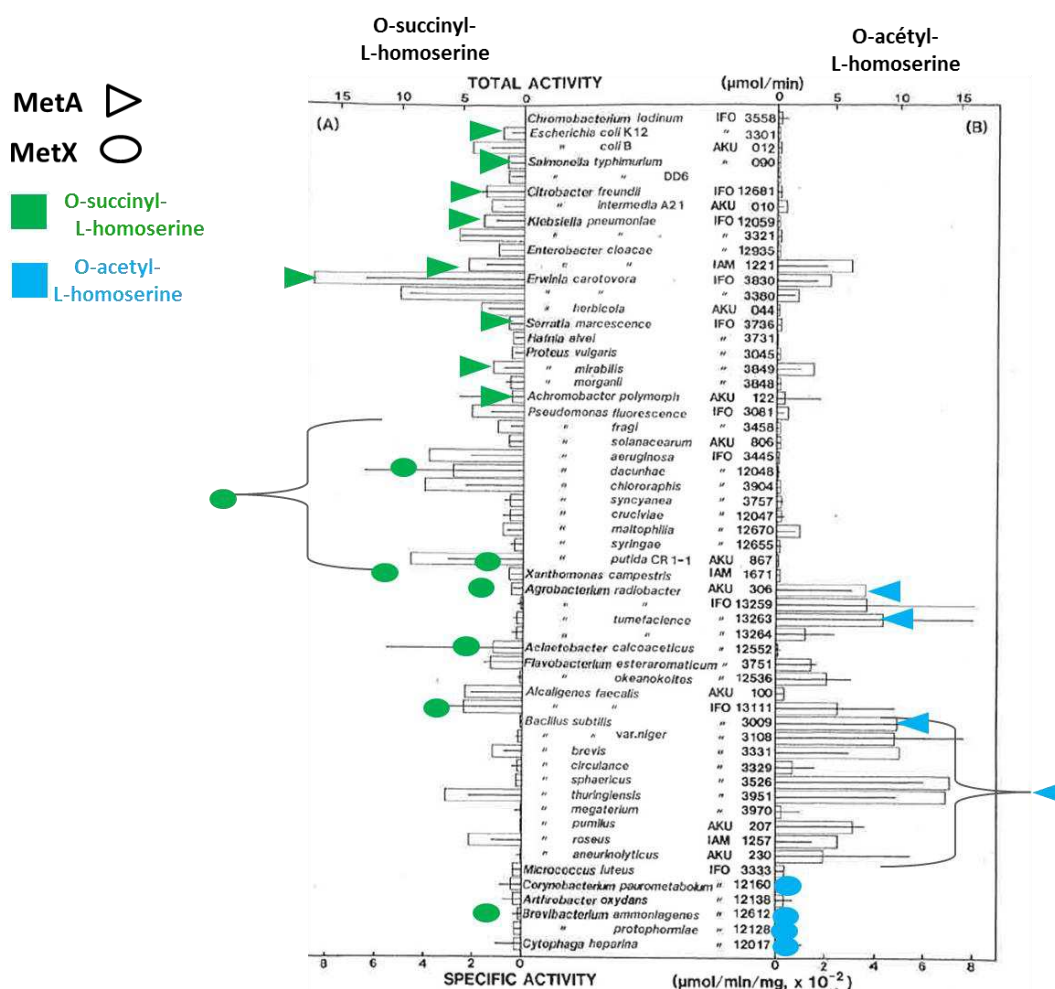


Figure 20 : Superposition des activités CGS mesurées dans l'étude de Kanzaki et al., 1986, et les données expérimentales obtenues dans l'étude de Bastard, Perret et al., 2017. La nature du gène qui code pour l'acyltransférase testée expérimentalement au laboratoire est symbolisée par un triangle pour MetA et un oval pour MetX. Le substrat préférentiel observé expérimentalement est en vert si c'est de l'O-succinyl-L-homoserine ou en bleu si c'est de l'O-acétyl-L-homoserine.

En étudiant la distribution phylogénétique des CGS encodées par les gènes *metB* qui partagent le motif InterPro IPR011821⁹⁴, Ferla et Patrick ont montré que la voie de transsulfuration (co-occurrence de la présence de CGS & CBL dans un organisme donné) semble presque exclusivement utilisée par les γ -protéobactéries⁵⁵, dont font partie *S. typhimurium* et *E. coli*. En dehors de ces dernières, seule une poignée d' α -protéobactéries et d'actinobactéries (dont *C. glutamicum*) semblent contenir à la fois une CGS et une CBL. À noter que leur analyse n'a pas permis de détecter l'enzyme MetB, pourtant expérimentalement caractérisée comme CGS, de l' ϵ -protéobactérie *H. pylori* (Uniprot ID : Q1M0P5) énoncée ci-dessus, et qui possède le motif IPR000277 (Cys/Met metabolism, pyridoxal phosphate-dependent enzyme), parent du motif IPR011821 (*O*-succinylhomoserine (thiol)-lyase) utilisé par les auteurs. Il en va de même pour MetI (Uniprot ID : O31631) de *B. subtilis*, chez qui la transsulfuration a été décrite, qui partage 41 % d'identité avec MetB_{coli} (Uniprot ID : P00935), mais ne possède pas cette signature InterPro. Cette étude ne rend donc pas compte de la distribution complète de la voie de transsulfuration, qui implique une CGS plus éloignée que celle des entérobactéries.

Par ailleurs, l'activité CGS a également été mesurée sur des extraits bruts, comme chez les actinobactéries *Corynebacterium glutamicum*, où MetB a été surexprimée⁹⁵, ou encore *Streptomyces phaeochromogenes*⁹⁶. Chez la Pseudomonadale *Pseudomonas syringae*, chez qui la L-cystathionine est source de soufre, Andersen *et al.* ont conclu à l'existence d'une voie de transsulfuration bien qu'aucune CGS n'ait été caractérisée⁷¹. Cependant, les auteurs n'excluent pas la présence de la deuxième voie, c.-à-d. de sulfhydrylation directe, comme voie secondaire. Il est à noter que cette voie directe a été décrite par Foglino *et al.* comme principale voie de biosynthèse de la méthionine chez *Pseudomonas aeruginosa*, comme nous le verrons ultérieurement.

Dans le genre *Bacillus*, il semble que l'enzyme CGS soit bifonctionnelle. En effet, tout comme cela avait été montré chez *Bacillus sphaericus* IFO 3526 (*Lysinibacillus sphaericus*), dont la probable CGS a été purifiée en 1987⁹⁷, l'étude de l'enzyme MetI_{subtilis} a montré sur extraits bruts qu'elle présentait également une double activité CGS (sur OAH, substrat physiologique) et *O*-acyl-L-homosérine sulfhydrylase (sur OAH et OSH)⁸⁶. Pour *B. sphaericus*, cette dernière activité atteint 50 à 22 % de l'activité principale CGS selon le substrat utilisé, OAH et OSH respectivement. À l'inverse, chez le déinococcus *Thermus thermophilus* HB8, les deux *O*-acétyl-L-homosérine sulfhydrylases homologues, Oah1⁹⁸ (Uniprot ID : Q93177) et Oah2⁹⁹ (Uniprot ID : Q76K51), ont toutes deux présenté une faible activité CGS (données non publiées par les auteurs), relativement accessoire par rapport à leur implication dans la voie de sulfhydrylation directe.

- Les cystathionine β -lyases (CBL)

La voie de transsulfuration ne serait pas complète sans la deuxième étape : la conversion de la cystathionine en homocystéine par l'enzyme MetC, une cystathionine β -lyases (CBL) comme citée précédemment et historiquement appelée cystathionase^{54,100} (EC 4.4.1.8). La CBL est un homologue proche de la CGS et agit sur son produit en catalysant une réaction de β -élimination au niveau du pont C-S du carbone β de la cystathionine (c'est une C β -S lyase). L'activité CBL a été observée pour la

première fois en 1962 par Wijesundera & Woods chez *E. coli*¹⁰¹, sur une enzyme identifiée depuis comme MetC (Uniprot ID : P06721), et partiellement purifiée pour la première fois en 1982 par Dwivedi et al.¹⁰². Dès 1964, Rowbury et al. ont observé la co-répression des activités CBL (MetC) et cystéine désulfhydrase (CD) par la méthionine, laissant supposer que la même enzyme était capable de catalyser à la fois les réactions CBL et CD⁵⁴. La purification par Flint et al.¹⁰³ et l'analyse d'un mutant $\Delta metC$ par Awano et al.¹⁰⁴ ont confirmé que MetC présente également une activité CD dans *E. coli*, la coupure de la cystéine impliquant comme sur la cystathionine le clivage C β -S, et le relargage de pyruvate et d'H₂S. Chez *B. subtilis*, Auger et ses collaborateurs ont montré en 2002 que MetC était assez peu spécifique et peut également catalyser la β -élimination du djenkolate, de la cystine et de la lanthionine. Cette promiscuité de β -élimination a également été mise en évidence pour la CBL TTHA1620 de *Thermus thermophilus* (Uniprot ID : Q5SHW0) mais plus faiblement (Arai et al., 2005)¹⁰⁵. Chez *Corynebacterium glutamicum*, Rückert et al. ont confirmé en 2003 que l'enzyme AecD (Uniprot ID : Q46061), déjà décrite par Rossol et Pühler¹⁰⁶ en 1992 et qui ne ressemble pas à la CBL d'*E. coli* ou *B. subtilis* (<30 % d'identité), agit physiologiquement comme une CBL avec également une activité CD¹⁰⁷. Par ailleurs, chez *Staphylococcus haemolyticus*, la CBL SH2636 (Uniprot ID : Q4L332) a aussi une activité marginale méthionine γ -lyase¹⁰⁸.

D'une manière générale, l'activité CBL semble être aussi une activité promiscuitaire *in vitro* (promiscuité de substrat pour un certain nombre d'enzymes) et parfois semble-t-il *in vivo*, ce qui rend difficile l'inventaire des CBL physiologiques. L'activité CBL est cependant retrouvée au moins *in vitro* chez un certain nombre d'enzymes dont ce n'est pas la fonction principale, notamment les enzymes impliquées dans la voie de transsulfuration réverse, MccB de *B. subtilis* par exemple (Hullo et al., 2007)¹⁰⁹ que nous aborderons plus tard.

Quelques autres enzymes présentent également cette activité de manière marginale. Chez *E. coli* par exemple, l'enzyme MalY (Uniprot ID : P23256), qui a une homologie structurale avec MetC malgré une faible similarité de séquence primaire¹¹⁰, a également une activité CBL *in vitro* alors que sa fonction principale semble être une fonction régulatrice agissant comme répresseur du régulon maltose¹¹¹. Ce cas illustre encore la difficulté d'extrapoler la fonction des enzymes de ces familles par comparaison de séquence ou même les caractérisations *in vitro* car MalY ne semble pas active *in vivo* en tant que CBL chez *E. coli*. En effet, le mutant $\Delta metC$ est auxotrophe à la méthionine comme l'ont montré Zdych et al.¹¹². La surexpression de MalY dans le mutant $\Delta metC_{coli}$ permet toutefois de lever son auxotrophie, démontrant quand même une faible activité CBL *in vivo*. Enfin, les auteurs ont démontré par mutagenèse dirigée que l'activité CBL de MalY, dont le substrat physiologique est ainsi inconnu¹¹³, n'est pas nécessaire à sa fonction de régulation. Les expériences d'Awano et al. ont montré également que, comme MetC, MalY avait une activité CD¹¹⁴. Les auteurs ont démontré que le quintuple mutant $\Delta metC tnaA cysK cysM malY$ était nécessaire pour réduire significativement l'activité CD chez *E. coli*. Par ailleurs, chez *B. subtilis*, PatB (Uniprot ID : Q08432) décrite par Auger et al. en 2005¹¹⁵ montre une activité CBL *in vitro*. Cependant, les données recueillies sur PatB et MalY montrent qu'elles catalysent mal la β -élimination de la cystathionine, tandis que leurs activités natives et leurs rôles physiologiques restent inconnus.

Chez les espèces de la classe des *Bacilli*, plusieurs gènes ont été montrés comme codant pour des CBL, mais celles-ci se sont révélées être le plus souvent des enzymes bi- voire tri- fonctionnelles. C'est le cas de Ctl1 (Uniprot ID : B3TNN8) et Ctl2 (Uniprot ID : B3TNN9), enzymes bifonctionnelles

CBL/CGL de *Lactobacillus casei* purifiées et caractérisées par Irmiler et al. en 2009¹¹⁶ ; de la CBL/CGL/méthionine γ -lyase (MGL) d'*Oenococcus oeni* (anciennement *Leuconostoc oenos*) décrite par Knoll et al. en 2011¹¹⁷, ou encore de PatC (Uniprot ID : Q1GA02) chez *Lactobacillus delbrueckii*¹¹⁸.

Pour rajouter à la promiscuité observée de ces enzymes, Soo et al. ont prouvé en 2016 que MetC_{coli} avait également une activité promiscuitaire alanine racémase¹¹⁹, promiscuité de réaction partagée en outre par plusieurs organismes (Ferla et al., 2017¹²⁰). Les auteurs ont décrit que l'alanine racémase ALR d'*E. coli* (enzyme à PLP de fold de type III ; voir aussi section 1.2.2.3) montre une promiscuité de réaction pour l'activité CBL, démontrée uniquement *in vivo*. La surexpression du gène *alr* complémente le mutant auxotrophe à la méthionine $\Delta metC$. Cette activité marginale a d'ailleurs pu être améliorée par mutagenèse en élargissant le site actif d'ALR (Uniprot ID : P0A6B4 ; mutant Y274F). À l'inverse, ils ont aussi montré que la CBL MetC_{coli} (enzyme à PLP de fold de type I) présente une légère activité alanine racémase, appuyant l'hypothèse d'un ancêtre commun avec une promiscuité de réaction qui se serait ensuite spécialisé avec seulement quelques mutations. De même, très récemment, Kato et al. ont mesuré une activité DL-alanine racémase avec l'enzyme MalY de *Lactobacillus sakei*¹²¹.

L'ensemble de ces exemples illustre qu'il est difficile d'attribuer correctement des fonctions physiologiques aux enzymes à PLP à partir des seules données du génome, sujet qui sera abordé plus en détail dans la partie 1.2.2.3.

Une manière de prédire l'existence de la voie de transsulfuration chez les organismes pourrait être d'identifier la co-présence dans le génome des deux gènes impliqués dans la voie, MetC et [MetB ou MetI] comme l'avaient fait Ferla et Patrick sur la distribution chez les protéobactéries. Cependant, il n'existe pas pour l'instant de motif InterPro spécifique des CBL qui incluerait les enzymes de type MetI. Belfaiza et al. ont noté que MetC et MetB semblent avoir un ancêtre commun mais, à ce jour, aucune enzyme codée par *metC* n'a été montrée à notre connaissance comme ayant une activité CGS (à retenir néanmoins le cas inédit des enzymes multifonctionnelles Cgl05/06 d'*Oenococcus oeni*, caractérisées *in vitro* par Knoll et al. comme CBL/CGL/MGL et potentiellement CGS¹¹⁷). D'ailleurs, chez *E. coli*, la surexpression de MetC ne permet pas de lever l'auxotrophie à la méthionine d'une souche $\Delta metB$, ni réciproquement la surexpression de MetB dans une souche $\Delta metC$ ¹²².

1.2.2.2 Voie de sulfhydrylation directe

Il semble en réalité que la plupart des bactéries effectuent la biosynthèse de l'homocystéine via une seule étape, la sulfhydrylation directe de l'acylhomosérine. Cette voie peut cependant coexister avec la voie de transsulfuration, l'une pouvant prédominer sur l'autre. Ces deux voies ne sont effectivement pas mutuellement exclusives et sont toutes deux retrouvées chez de nombreuses espèces, leur fournissant probablement de la flexibilité métabolique. En effet, le coût d'utilisation de la cystéine comme source de groupement thiol est plus coûteuse, mais la cystéine est souvent plus disponible que le sulfure d'hydrogène (H₂S) qui s'avère être hautement volatil.

La sulfhydrylation directe implique le remplacement du groupement *O*-acyle de l'homosérine activée par du sulfure d'hydrogène libre (réaction de γ -substitution - figure 21), générant ainsi directement l'homocystéine. Cette réaction est catalysée soit par une *O*-acétylhomosérine sulfhydrylase (OAHS), soit par une *O*-succinylhomosérine sulfhydrylase (OSHS) suivant le produit de l'acylation de l'homosérine par MetX ou MetA. Il est cependant difficile par simple similarité de séquence de prédire quel est le type de substrat utilisé.

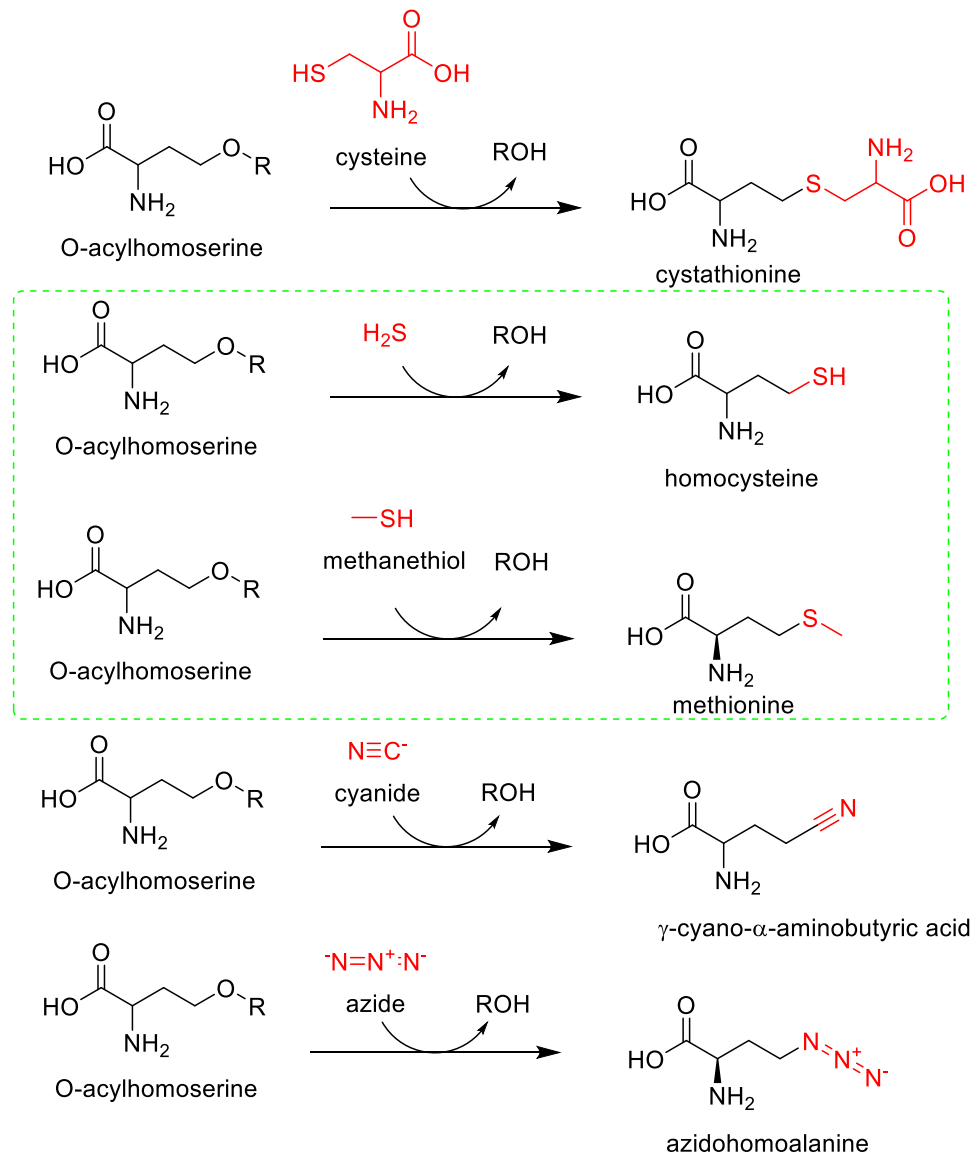


Figure 21 : Diversité des réactions de γ -substitution sur l'*O*-acétylhomosérine catalysées par des enzymes bactériennes. Les réactions de sulfhydrylation permettant la synthèse directe de la L-homocystéine à partir d' H_2S et de L-méthionine à partir de méthanethiol sont encadrées en vert (modifié de Ferla et Patrick, 2014).

- **Les *O*-acétyl-L-homosérine sulfhydrylases (OAHS)**

L'activité OAHS a été identifiée initialement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*¹²³ chez qui elle est catalysée par Met17 (ou Met25 ; Uniprot ID : P06106) mais aussi détectée chez la bactérie

*Brevibacterium flavum*¹²⁴. L'enzyme OAHS a été appelée ensuite MetY et caractérisée chez *Leptospira meyeri*¹²⁵, nom qui sera ensuite conservé pour les enzymes bactériennes de cette famille. Chez *L. meyeri*, Belfaiza et al., ont montré que MetY (Uniprot ID : P94890) ne catalyse pas la réaction avec l'OSH mais a une activité spécifique similaire *O*-acétylhomosérine sulfhydrylase (OAHS) et *O*-acétylsérine sulfhydrylase (OASS). Ils ont également montré que MetY est rétro-inhibée à de fortes concentrations (10 mM) de L-méthionine et/ou de SAM. Les auteurs ont d'ailleurs remarqué que MetY_{meyeri} était plus proche des enzymes de levure Met25_{cerevisae} (plus de 47 % d'homologie) que de MetB_{coli} (33 %) ou MeZ_{aeruginosa} (38 %) (figure 22). Notamment, MetY_{meyeri} et les enzymes de levure ont une quarantaine d'acides aminés absents de MetB et MetZ.

1:	tr	P94890	P94890_LEPME	100.00	47.28	38.04	32.90
2:	sp	P06106	CYSD_YEAST	47.28	100.00	36.53	29.50
3:	sp	P55218	METZ_PSEAE	38.04	36.53	100.00	37.27
4:	sp	P00935	METB_ECOLI	32.90	29.50	37.27	100.00

Figure 22 : Matrice de comparaison de séquences entre MetY de *L. meyeri* avec Met25 de *S. cerevisiae*, MetB d'*E. coli* et l'OSHS MetZ de *P. aeruginosa*. Alignement réalisé via Clustal omega (<https://www.ebi.ac.uk>).

Les exemples d'organismes pour lesquels il existe des preuves expérimentales de l'existence d'une voie de sulfhydrylation directe pour la biosynthèse de la méthionine sont plus nombreux que pour la transsulfuration, et sont résumés dans un tableau en annexe 2. Cependant peu d'*O*-acylhomosérine sulfhydrylases ont été purifiées afin d'être caractérisées, et la plupart d'entre elles s'avèrent être des OAHS : c'est le cas de celle de *Brevibacterium flavum* en 1982¹²⁴, de *Lysinibacillus sphaericus* IF0 3526 en 1987⁹⁷, de celle codée par le gène *metY* chez *Leptospira meyeri* en 1998¹²⁵, des OAHS 1 et 2 des gènes *oah1* et *oah2* de *Thermus thermophilus* HB8 en 2001 et 2004 respectivement^{98,99} et de l'OAHS probable MetY (gène *WS1012*) de *Wolinella succinogenes* en 2011¹²⁶. Chez cette ϵ -protéobactérie, la biosynthèse de la méthionine peut se faire par l'intermédiaire d'une protéine thiocarboxylée nommée HcyS-COSH (figure 23). Cette dernière peut être comparée aux protéines thiocarboxylées déjà décrites et impliquées par exemple dans la biosynthèse de la cystéine (CysO-COSH, voir section 1.1.1.1) ou de la vitamine B1 (ThiS-COSH), pour ne citer qu'elles¹²⁶. Brièvement, l'extrémité C-terminale HcyS est d'abord activée à l'aide de 2 métalloprotéases HcyDF avant de subir une substitution nucléophile par du HS⁻ produit à partir de sulfite via l'enzyme Sir. Le résultat de ces réactions est la protéine thiocarboxylée HcyS-COSH, sur laquelle l'enzyme à PLP MetY (Uniprot ID : Q7M9C8) catalyse alors le transfert de l'*O*-acétylhomosérine. Enfin, suite à un réarrangement d'acyl S/N et à l'hydrolyse par HcyD, l'homocystéine est relarguée et HcyS est libérée.

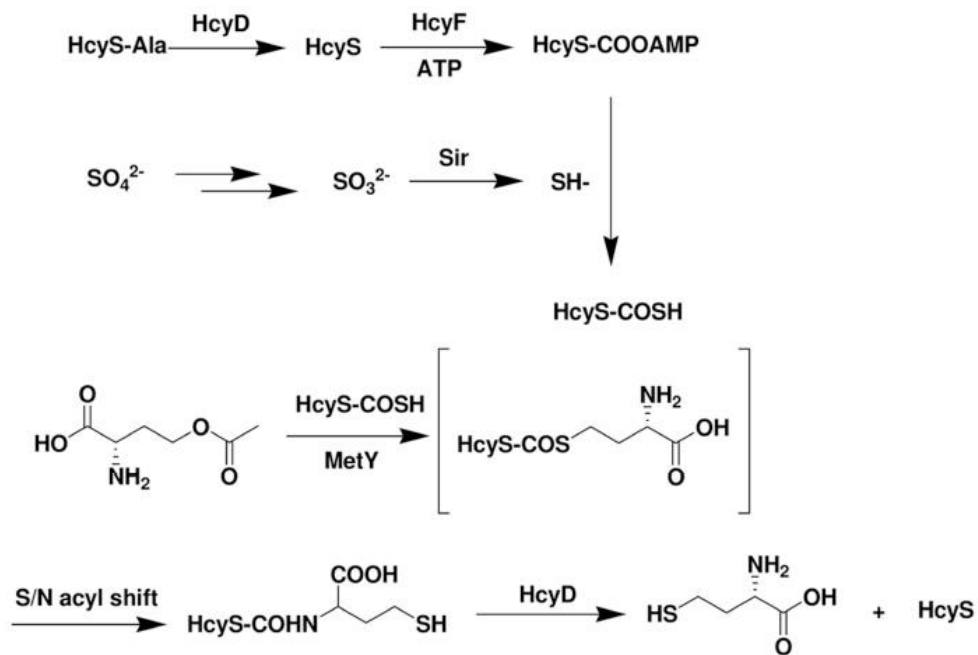


Figure 23 : Nouvelle voie de biosynthèse de la L-homocystéine médiée par la protéine thiocarboxylée HcyS décrite chez la Protéobactérie *Wolinella succinogenes* (issu de Krishnamoorthy et Begley, 2011).

D'un point de vue général, les enzymes codées par *metY* (famille InterPro IPR006235 - *O*-acétylhomoserine/*O*-acétylsérine sulfhydrylase) et admises comme catalysant la sulfhydrylation directe de l'OAH sont répandues dans toutes les classes de bactéries⁵⁵, illustrant qu'il s'agit probablement de la voie prédominante pour la synthèse de l'homocystéine. Historiquement, et le plus souvent, elles sont nommées *O*-acétylhomosérine thiolases (Kerr, 1971⁶⁰ ou encore Aitken & Kirsch, 2005¹²⁷). Occasionnellement, elles sont également appelées *O*-acétylhomosérine (thiol)-lyases, d'après leur classification initiale par la Commission des enzymes (EC 4.2.99.10). Cependant le nom actuellement utilisé est *O*-acétylhomosérine aminocarboxypropyltransférases, car elles ont depuis été reclassées en tant que transférases (EC 2.5.1.49) par la Commission Enzyme (Bairoch, 2000¹²⁸) mais les deux noms perdurent dans les bases de données.

Ces enzymes ont une certaine promiscuité de substrat quant aux molécules soufrées qu'elles peuvent utiliser pour catalyser la thiolation. L'OAHs de *Rhodospirillum rubrum* par exemple est spécifique du méthane-thiol (isolée et caractérisée en 2012 par Erb et al.¹²⁹), permettant ainsi chez cet organisme la biosynthèse directe de la méthionine à partir de l'homosérine activée (figure 24). Chez *C. glutamicum*, MetY est quant à elle capable d'utiliser l'H₂S (Hwang et al., 2007)⁶⁸ et le méthane-thiol comme donneur de soufre (Bolten et al., 2010)¹³⁰. L'activité de MetY sur méthane-thiol s'est révélée inférieure à celle observée sur Na₂S, soit 60 mU/mg contre 480 mU/mg respectivement. Cependant dans un contexte biotechnologique, Krömer *et al.* ont remarqué que *C. glutamicum* peut utiliser MetY pour synthétiser *in vivo* des niveaux élevés de méthionine en milieu alimenté par du méthane-thiol exogène¹³¹. L'OAHs de *Bacillus stearothermophilus* CN3, quant à elle, a été utilisée par Omura et al. en 2003 dans la formation de l'acide γ -cyano- α -aminobutyrique (figure 21), afin de produire cette molécule d'intérêt pour l'imagerie biomédicale¹³².

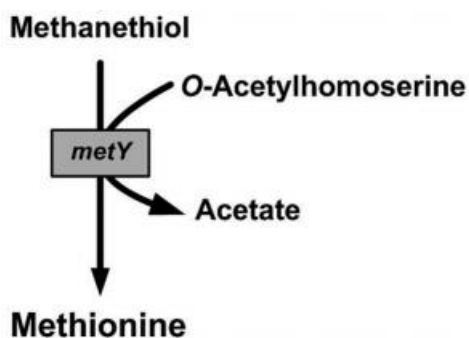


Figure 24 : Voie de sulfhydrylation directe à partir de méthanethiol comme donneur de soufre, catalysée par MetY de *Rhodospirillum rubrum* ou *Corynebacterium glutamicum*.

Lors de l'annotation des génomes, plusieurs difficultés sont rencontrées. Aussi bien la transsulfuration que la sulfhydrylation sont réalisées par des enzymes à PLP recrutées au cours de l'évolution dans la même famille d'enzymes à PLP. En l'absence de MetC, clairement identifiable compte tenu de la diversité des séquences, il est difficile d'assigner une prédiction MetB ou MetZ/MetY à une protéine d'un génome et d'en déduire le type de voie empruntée. Chez la plupart de ces organismes, où d'ailleurs des paralogues existent, la difficulté n'est pas tant de savoir si la voie de transsulfuration existe en parallèle, mais si elle est réellement utilisée *in vivo* et/ou si la voie de sulfhydrylation est privilégiée. Chez *P. aeruginosa*, Foglino et al. ont montré par exemple que la voie de sulfhydrylation est celle majoritairement utilisée⁷⁰, alors que chez *C. glutamicum*, Hwang et al. ont prouvé que les deux voies co-existent en parallèle suivant les conditions de culture⁶⁸.

À la promiscuité des donneurs de soufre potentiels s'ajoute une promiscuité de réaction souvent mesurée *in vitro*. Chez *T. thermophilus*, comme énoncé dans la partie précédente, les OAHS présentent une « légère » activité CGS selon les auteurs ; même observation avec l'OAHS de *B. flavum* ; activité CGS deux fois plus importante pour l'enzyme testée provenant de *L. sphaericus* ; chez *L. meyeri*, probablement pas de transsulfuration selon Belfaiza *et al.*, mais probablement selon Picardeau et al.¹³³ dont l'équipe a montré que le mutant $\Delta metY$ pousse sur milieu sans méthionine ; enfin chez *W. succinogenes*, une autre enzyme annotée comme putative O-acétyl/succinyl-L-homosérine sulfhydrylase (MetZ) et codée par le gène *WS1015*, ne semble pas impliquée dans la sulfhydrylation comme son homologue MetY (*WS1012*). À l'inverse, la CGS MetI de *B. subtilis* a montré une activité homosérine sulfhydrase sur extrait brut⁸⁶.

Enfin en 2004, Qin et Martin ont cloné et étudié le gène codant pour une putative OAHS à partir de la bactérie Firmicute *Selenomonas ruminantium* HD4¹³⁴. Les auteurs ont souligné le fort pourcentage d'identité entre la séquence nucléotidique de leur gène et celles codant pour l'OAHS de *B. stearothermophilus* et la MetY de *C. glutamicum* (63 % chacun), ainsi que le pourcentage de similarité avec les séquences protéiques des enzymes Met25 de *S. cerevisiae* et MetZ de *P. aeruginosa* (45 % chacun). Des expériences de complémentation avec des souches mutantes *metA*, *metB* et *metC* d'*E. coli* ont montré que le gène OAHS de *S. ruminantium* peut compléter la mutation *metC* et permettre la croissance sur des milieux minimaux contenant du thiosulfate de sodium comme seule source de soufre. Les auteurs ont finalement suggéré que le produit de ce gène dans *S. ruminantium* était bien une OAHS mais leurs résultats ne permettent pas pour autant de définir le chemin emprunté pour la biosynthèse de l'homocystéine.

- **Les O-succinyl-L-homosérine sulfhydrylases (OSHS)**

Fogolino et al. ont été les premiers à décrire une O-succinylhomosérine sulfhydrylase chez *P. aeruginosa* (gène PA0503) qu'ils ont nommée MetZ (Uniprot ID : P55218)⁷⁰. Ils ont montré que MetZ_{aeruginosa} était spécifique de l'OSH. Ils ont également noté que, bien que globalement MetZ était similaire à Met25_{cereviaie} et MetB_{coli}, il y avait localement une meilleure conservation de séquence avec l'enzyme de la levure.

Très peu d'études ont concerné les enzymes MetZ (famille InterPro IPR006234 - O-succinylhomosérine sulfhydrylase). MetZ est annotée comme O-succinylhomosérine thiolase⁹⁴, et admise comme catalysant la sulfhydrylation directe de l'OSH pour former l'homocystéine⁶¹. MetZ est rarement rencontrée dans les génomes bactériens en dehors des Protéobactéries⁵⁵. À notre connaissance, aucune enzyme O-succinylhomosérine thiolase n'a encore été caractérisée biochimiquement sur enzyme purifiée et une seule structure (non publiée) d'O-succinylhomosérine thiolase ou OSHS existe (celle de *Mycobacterium tuberculosis*, déposée dans la PDB sous l'ID : 3NDN). Cependant, l'activité OSHS de MetZ de la cyanobactérie *Rhizobium etli* a pu être démontrée *in vivo* et les auteurs ont montré que, chez cet organisme, seule la sulfhydrylation directe devait exister contrairement à *P. aeruginosa* (Taté et al., 1999)¹³⁵.

Chez *Pseudomonas*, la voie de sulfhydrylation a été étudiée pour trois espèces différentes : *P. aeruginosa*, *P. putida* et *P. sp.* FM518. Bien que la transsulfuration ne soit pas la voie privilégiée pour la biosynthèse de l'homocystéine chez ces organismes, elle semble néanmoins présente aux côtés de la voie de sulfhydrylation chez la plupart des différentes espèces de *Pseudomonas* étudiées jusqu'à aujourd'hui. Nous ne reviendrons cependant pas ici sur la potentielle exception de *P. syringae*, dont le cas a été abordé dans la partie « transsulfuration » et pour lequel aucun argument ne permet de dire si la voie de sulfhydrylation est absente ou non.

Chez le méthylo-trophe facultatif *Pseudomonas sp.* FM518 étudié par Morinaga et al., l'activité sulfhydrase mesurée sur lysat s'est avérée relativement forte mais une activité CBL a également été détectée et une forte inhibition de sa cystéine synthase par la méthionine (Ki = 1,6 mM) a été observée¹³⁶. Les auteurs en ont conclu que la régulation de la biosynthèse de la cystéine par la méthionine et la présence d'une cystathionine lyase constituaient les preuves de l'existence de la voie de transsulfuration mais qu'elle n'est vraisemblablement pas la voie privilégiée chez cette bactérie pour la biosynthèse de l'homocystéine. Il semble par ailleurs en aller de même pour *P. putida* : l'activité OSHS a été mesurée sur différents extraits cellulaires cultivés chacun sur une source de soufre différente ; Vermeij et Kertesz ont ainsi mesuré sur la souche S-313 de *P. putida* cultivée sur sulfate et cystéine une conversion en homocystéine de 32 à 66 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ de protéine respectivement (valeurs similaires pour la souche PAO1 de *P. aeruginosa*), contre une conversion nulle chez *E. coli*¹³⁷. Ils ont ensuite mesuré les activités CGS et CBL de la voie de transsulfuration et les ont comparées à celle d'*E. coli* : l'activité CGS s'est avérée faible selon les auteurs et la conversion de la cystathionine en homocystéine était de 2 à 4 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ pour *Pseudomonas* (en culture sur cystéine) contre 34 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ pour *E. coli*. Ces résultats illustrent chez *P. putida* la présence d'une voie de sulfhydrylation directe particulièrement active comparée à la transsulfuration. Quant à *P. aeruginosa*, ces résultats concordent avec les précédentes observations de Fogolino *et al.* : les auteurs ont remarqué qu'un mutant Δ metZ est auxotrophe à la méthionine mais possède une croissance lente sur cystéine ;

or cette souche peut-être complétée par le gène *metB* d'*E. coli* sur *O*-succinylhomosérine, laissant penser que l'expression de MetB vient renforcer la voie de transsulfuration déjà présente mais mineure chez *P. aeruginosa*⁷⁰. En comparaison de *P. syringae*, ces résultats suggèrent que deux organismes aussi étroitement liés que *P. aeruginosa* et *P. syringae*, qui se trouvent dans un même groupe d'homologie d'ARNr mais des groupes d'homologie d'ADN distincts¹³⁸, pourraient synthétiser la méthionine via des voies distinctes.

- **Sulfhydrylation du L-aspartate-semialdéhyde**

La plupart des archéobactéries méthanogènes utilisent une voie différente. Bien que ces organismes utilisent également du sulfure d'hydrogène comme source de soufre, l'autre précurseur pour la production de L-homocystéine n'est pas l'acylhomosérine mais le L-aspartate-semialdéhyde, produit à partir du L-aspartate (figure 25). Des expériences d'assimilation isotopique chez *Methanococcus maripaludis* ont démontré que le soufre présent dans la méthionine de cette bactérie est dérivé du H₂S, comme c'est le cas dans la voie bactérienne précédemment décrite. Pourtant, la plupart des archées méthanogènes ne possèdent pas les gènes nécessaires à la conversion de la L-homosérine en L-homocystéine, essentielle à cette voie¹³⁹. Une autre étude a identifié deux gènes (MA_1821 (Uniprot ID : Q8TPT4) et MA_1822 (Uniprot ID : Q8TPT3)) essentiels à la biosynthèse de la L-homocystéine chez *Methanosarcina acetivorans*, bien que la fonction exacte de ces gènes était alors inconnue¹⁴⁰.

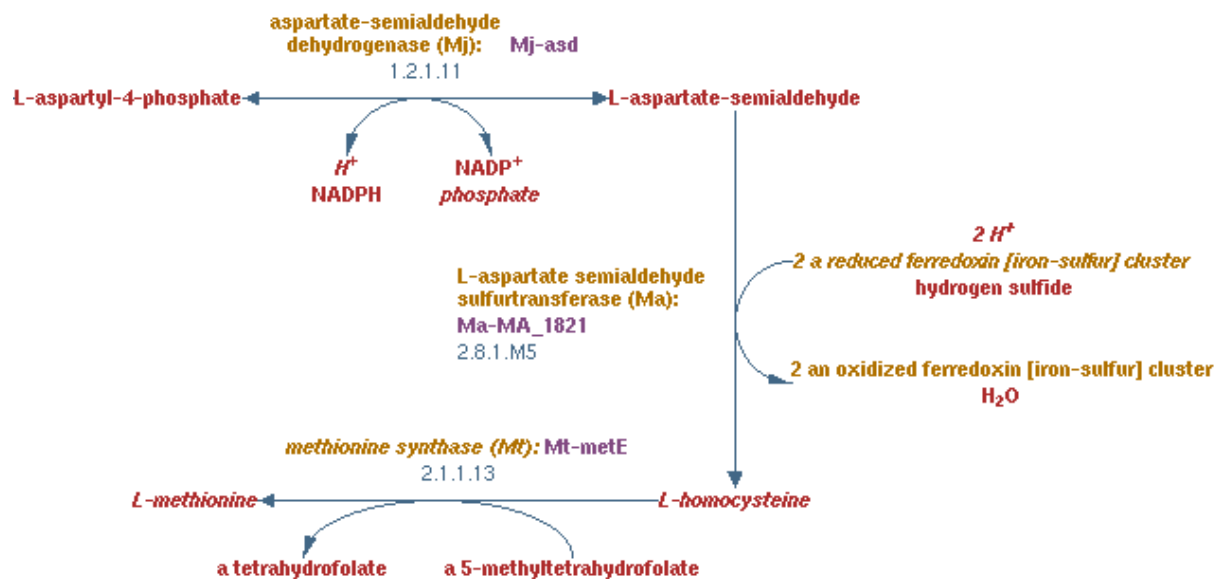


Figure 25 : Biosynthèse de la L-méthionine chez les archées à partir du L-aspartate semialdéhyde (issu de MetaCyc Pathway: L-methionine biosynthesis IV (archaea)).

C'est une étude ultérieure réalisée avec *Methanocaldococcus jannaschii* qui a permis de démontrer que l'incubation d'extraits cellulaires avec du L-aspartate-semialdéhyde et du H₂S entraîne une augmentation de la concentration de L-homocystéine.¹⁴¹ Les chercheurs ont soupçonné que la nouvelle activité était corrélée avec les gènes MA_1821 et MA_1822. L'analyse d'un mutant *M. acetivorans* dépourvu du gène *oah* (codant pour une *O*-acétylhomosérine aminocarboxylpropyltransférase intervenant dans cet organisme) a confirmé la production de

L-homocystéine à partir de L-aspartate-semialdéhyde et de sulfure d'hydrogène. Lorsque les gènes MA_1821 et MA_1822 ont également été supprimés, la production de L-homocystéine a été abolie. En outre, lorsque les extraits cellulaires ont été incubés avec de l'OAH, substrat de l'OAH codée par *oah*, la souche Δoah a montré une activité de biosynthèse d'homocystéine significativement réduite alors que la souche $\Delta MA_1821/MA_1822$ a continué à le produire. Ensemble, ces résultats suggèrent que MA_1821 et MA_1822 sont impliqués dans la biosynthèse de L-homocystéine à partir de sulfure d'hydrogène et de L-aspartate-semialdéhyde⁸⁴.

La protéine MA_1821 est composée de deux domaines de cystathionine β -synthase (CBS) à l'extrémité C-ter et d'un domaine DUF39 à l'extrémité N-ter. Des travaux antérieurs ont fourni des structures cristallines de la paire de domaines CBS de la protéine homologue de *M. jannaschii* et démontré que ce domaine se lie à la S-adénosyl-L-méthionine (SAM) et à la S-méthyl-5'-thioadénosine, induisant un changement conformationnel compatible avec une fonction de régulation¹⁴². Il a été proposé que le site actif est situé dans le domaine DUF39, et que la liaison de la SAM ou de la S-méthyl-5'-thioadénosine aux domaines CBS pourrait fonctionner comme un mécanisme d'inhibition en feedback pour supprimer la biosynthèse de la SAM en aval^{140,141}. Il est à noter que cette réaction de sulfhydrylation du L-aspartate-semialdéhyde comprend une réduction et nécessite donc un donneur d'électrons. La protéine MA_1822, annotée en tant que ferredoxine, est susceptible de remplir cette fonction.

1.2.2.3 Problèmes d'annotation des enzymes de ces voies

La prédiction du métabolisme grâce aux réseaux métaboliques reconstruits à partir de la connaissance des réactions enzymatiques, ainsi que de nombreux projets de biologie de synthèse pour la biosynthèse de composés d'intérêts, se font notamment à partir des informations génomiques stockées dans les bases de données publiques. L'un des principaux problèmes rencontrés dans ce cas est l'incohérence dans l'annotation fonctionnelle de nombreux gènes pertinents pour ces voies, ceci étant particulièrement vrai pour le métabolisme du soufre comme nous l'avons vu tout au long de cette introduction. Ces gènes sont en effet pour la plupart des membres recrutés et spécialisés au cours de l'évolution dans de très grandes familles de protéines. De plus, même lorsque l'annotation fonctionnelle est correcte, elle ne reflète parfois qu'une partie du potentiel fonctionnel complet de la protéine, car les larges spécificités de substrat ne sont souvent pas prises en compte dans l'annotation.

Une grande partie de la diversité des voies bactériennes de la biosynthèse de la méthionine est attribuable aux différences existant dans les étapes de sulfurylation. Malgré tout, les enzymes impliquées dans la sulfurylation de l'homoserine (MetB, MetC, MetY et MetZ), ainsi que les cystathionine γ -lyases ou CGL (MtcC pour *Klebsiella pneumoniae*¹⁴³ et MccB pour *B. subtilis*), impliquées dans la biosynthèse de la cystéine, présentent toutes un pourcentage d'identité non négligeable (>30 %) et nécessitent toutes comme nous l'avons évoqué du pyridoxal-5'-phosphate (PLP) pour leur activité. Le PLP est un coenzyme dérivé de la vitamine B6. Plus généralement, le terme "vitamine B6" désigne un ensemble de six composés de 3-hydroxy-2-méthylpyridine biologiquement interconvertibles : le pyridoxal, la pyridoxine, la pyridoxamine et leurs 5'-phosphates respectifs. Parmi eux, le PLP constitue donc la principale forme métaboliquement active, servant de cofacteur pour une variété d'enzymes présente chez tous les organismes, et responsable d'un large spectre de réactions sur les acides aminés et les amines -à l'exception des glycogène phosphorylases¹⁴⁴. Parmi les réactions les plus courantes effectuées par ces enzymes, on retrouve des transaminations, décarboxylations,

racémisations, β -éliminations et β -substitutions, γ -éliminations et substitutions, et des condensations de Claisen et retro-Claisen (figure 26).

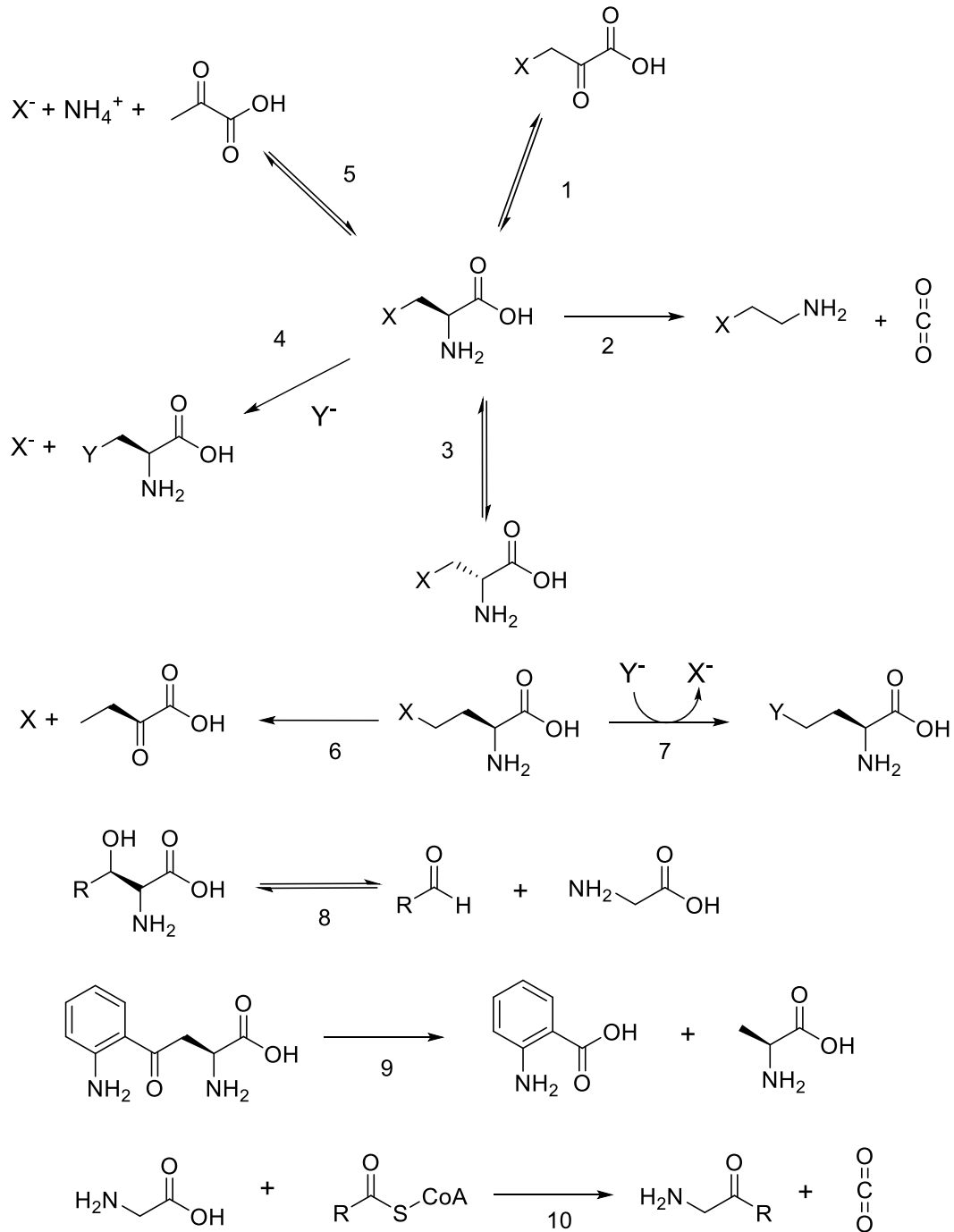


Figure 26 : Panel de réactions catalysées par les enzymes à PLP. (1) Transamination (2) Décarboxylation (3) Racémisation (4) β -substitution (5) β -élimination (6) γ -élimination (7) γ -substitution (8) Retro-aldol (9) Retro-Claisen (10) Claisen (modifié de Philips RS, 2015).

L'interrogation soulevée par la grande variété de réactions catalysées par ces enzymes est la suivante : comment sélectionnent-elles le type de réaction souhaitée et le type de substrat transformé. La réponse à cette question est cruciale lorsque l'on sait que la Commission Enzyme référence plus de 160 activités catalysées par des enzymes PLP-dépendantes (soit environ 4% de l'ensemble des

activités référencées)¹⁴⁵ et que ,malgré leur large variété fonctionnelle (au moins 10 activités décrites à ce jour, figure 26), toutes les enzymes à PLP structurellement caractérisées ont été classées en seulement 5 groupes structuraux distincts (tableau 2)^{146,147}, ces groupes étant censés représenter autant de lignées évolutives indépendantes^{148,149}. Le faible nombre de lignées évolutives différentes les impliquant et le large panel d'activités catalytiques les concernant en font un exemple frappant d'évolution divergente, et ce d'autant plus que ces enzymes ont des structures et des séquences similaires. Par ailleurs, en raison des similitudes mécanistiques entre enzymes à PLP et de leur diversité structurelle limitée, déduire la fonction de ces catalyseurs uniquement en fonction de la similarité des séquences entraîne des difficultés particulières d'annotation.

N° GROUPE STRUCTUREL / TYPE STRUCTURAL					
I	II	III	IV	V	VI et VII
Superfamille des aspartate aminotransférases	Famille β / tryptophane synthase	Famille alanine racemase	Famille D-amino acides aminotransférase		
ACTIVITÉS					
Transamination	β -substitution	Racémase	Aminotransférase	Glycogène phosphorylase	Lysine aminomutase (PLP-dépendante)
Décarboxylation	β -élimination				Lysine β -aminomutase (SAM-dépendante)
β -élimination					

Tableau 2 : Classement des enzymes à PLP en 7 groupes structuraux.

Néanmoins, Dunathan a proposé dès 1966 que la spécificité de réaction d'une enzyme à PLP est contrôlée par l'orientation, perpendiculaire, de la liaison clivable par rapport au plan du cycle pyridine du PLP¹⁵⁰. En outre, si le groupe carboxylique est perpendiculaire, la réaction sera une décarboxylation, mais si la liaison C-H est perpendiculaire, alors une déprotonation se produira. Et lorsque la chaîne latérale est perpendiculaire, alors une réaction tel que le clivage C α -C β rétro-aldol peut se produire (figure 27).

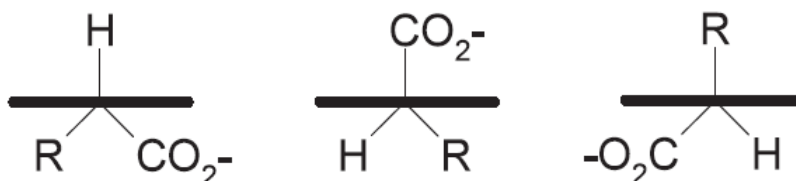


Figure 27 : Illustration de l'hypothèse de Dunathan. La liaison clivable est orientée perpendiculairement au plan formé par le cycle pyridine du PLP (issu de Philips RS, 2015).

Toutes ces réactions enzymatiques sont par ailleurs dépendantes de la capacité du PLP à stabiliser par résonance, à divers degrés, les intermédiaires réactionnels α -carbanioniques du substrat, souvent apparentés à des intermédiaires quinonoïdes (figure 28) formés lors de l'élimination d'un

proton, d'un carboxylate ou d'une chaîne latérale reliée au C α . La stabilisation de ces intermédiaires réactionnels carbanions est rendue possible par la formation d'une base de Schiff lors de la fixation du substrat avec le PLP. Cette base de Schiff, de type aldimine (RN=CR'R'', où R est un alkyle ou un aryle) est située entre le PLP et le substrat et agit alors comme un puits d'électrons stabilisateur¹⁵¹. En reprenant cette donnée dans sa revue de 2011, Toney a tenté de résumer les mécanismes par lesquels la spécificité d'une réaction peut être atteinte dans une enzyme à PLP en se concentrant sur trois aspects de ces réactions : les effets stéréoélectroniques, l'état de protonation de l'intermédiaire aldimine externe, et l'interaction de l'intermédiaire carbanion avec les chaînes latérales des acides aminés présents dans le site actif de la protéine¹⁵². Ce dernier aspect fait par ailleurs partie des facteurs déterminants entrant en jeu dans la caractérisation de la spécificité de substrat d'une enzyme à PLP, et ce, cette fois, pour une réaction donnée.

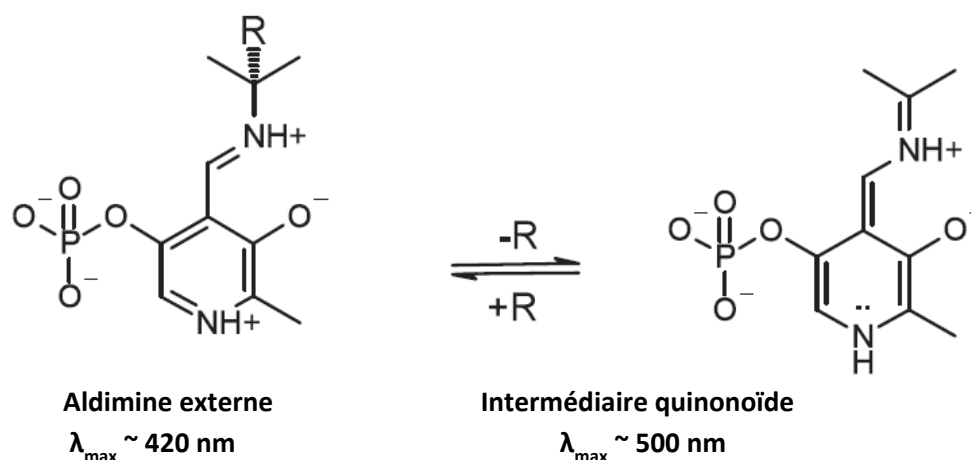


Figure 28 : Intermédiaires PLP aldimine et quinonoïde (issu de Phillips RS - 2015).

La problématique de la spécificité de réaction et de substrat des enzymes à PLP se trouve donc au cœur du métabolisme du soufre. Les CGS, codées par *metB*, et les *O*-acylhomosérine thiolases, codées par *metY* et *metZ*, catalysent toutes des réactions de substitution de type γ . Le mécanisme de la cystathionine γ -synthase d'*E. coli* a été particulièrement bien étudié par Aitken et al.^{127,153} (figure 29). La réaction de substitution en position γ débute avec la fixation du substrat, OSH ou OAH, formant une base de Schiff avec le PLP, et permettant ainsi d'éliminer le groupement acétyl ou succinyl sous forme d'acétate ou de succinate. Il en résulte un intermédiaire lié au PLP avec une chaîne latérale vinylique, qui est ensuite attaqué par le second substrat (cystéine, sulfure d'hydrogène ou méthane-thiol) pour donner la cystathionine, l'homocystéine ou la méthionine, respectivement.

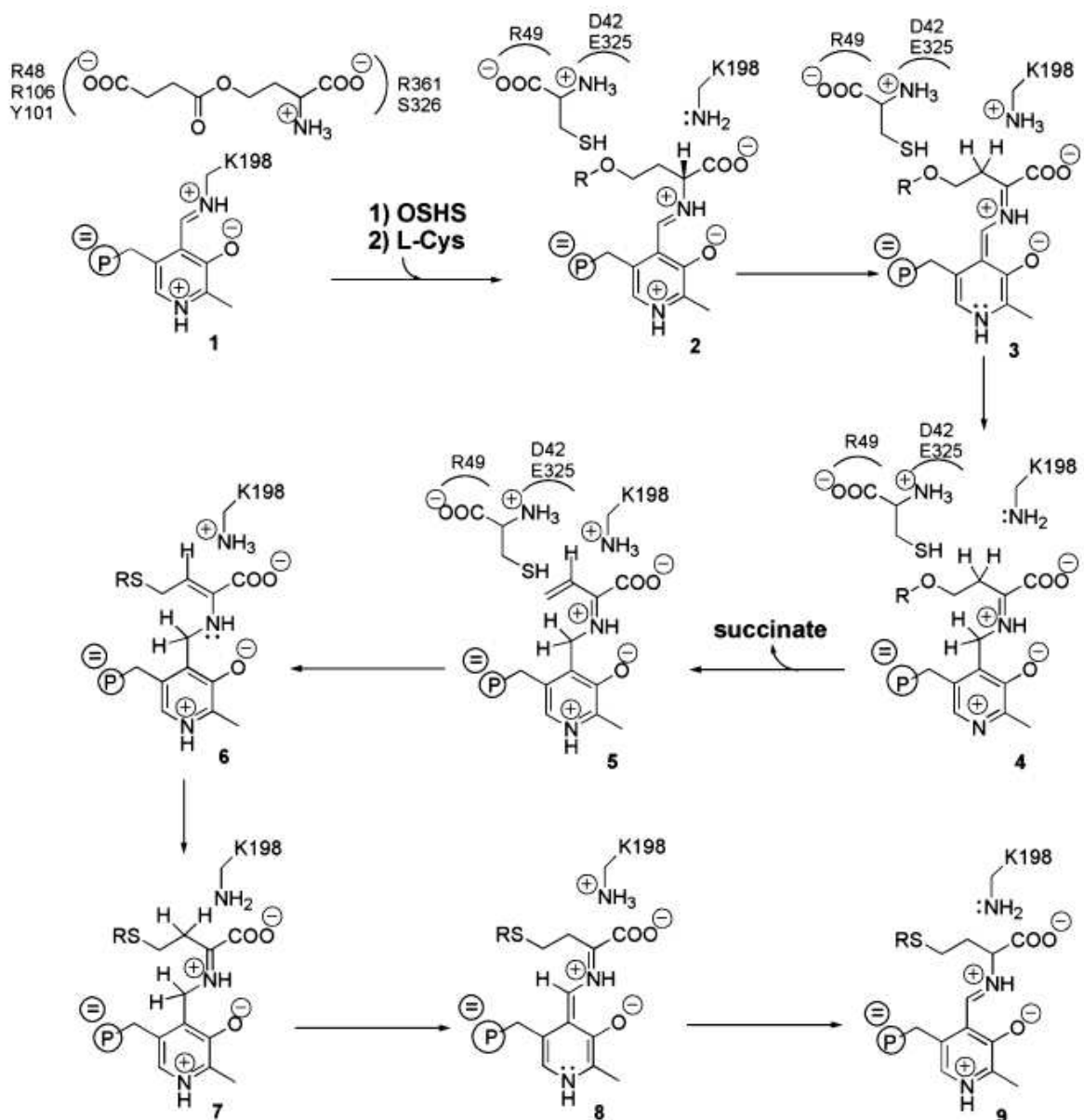


Figure 29 : Mécanisme enzymatique de la réaction de γ -substitution telle qu'effectuée par la CGS d'*E. coli* (eCGS) sur l'*O*-succinylhomosérine. La structure n°5 est celle proposée par Brzovic et al.¹⁵⁴ et l'attribution des résidus du site actif est basée sur la structure cristalline de l'eCGS¹⁵⁵ (issu de Aitken et Kirsch, 2005).

Les CBL (généralement codées par *metC*) sont des homologues proches des CGS, mais catalysent la réaction de β -élimination de la cystathionine (CTT). Lors de la première étape, la CTT forme une base de Schiff avec le PLP. Cela permet, suite à la formation de l'intermédiaire quinonoïde, de relarguer l'homocystéine (figure 30, élément RH relargué entre les structures 3 et 4). Ce qu'il reste du substrat lié au PLP, c.-à-d. l'ainoacrylate, est libéré et hydrolysé spontanément en pyruvate et en ammoniac¹¹⁰ (en raison de la tautomérie énamine-cétimine). En 2003, Messerschmidt et al. ont superposé les structures des deux enzymes d'*E. coli* (ainsi que la CGL de *S. cerevisiae*) et ont remarqué qu'elles étaient presque identiques, avec une déviation quadratique moyenne de seulement 1,5 Å sur 350 positions de C_{α} ¹⁵⁶. Par la suite, plusieurs études ont tenté de cartographier les déterminants de la spécificité de

ces deux enzymes impliquées dans la transsulfuration (revues de Aitken & Kirsch en 2005¹²⁷ et de Aitken et al. en 2011¹⁵⁷).

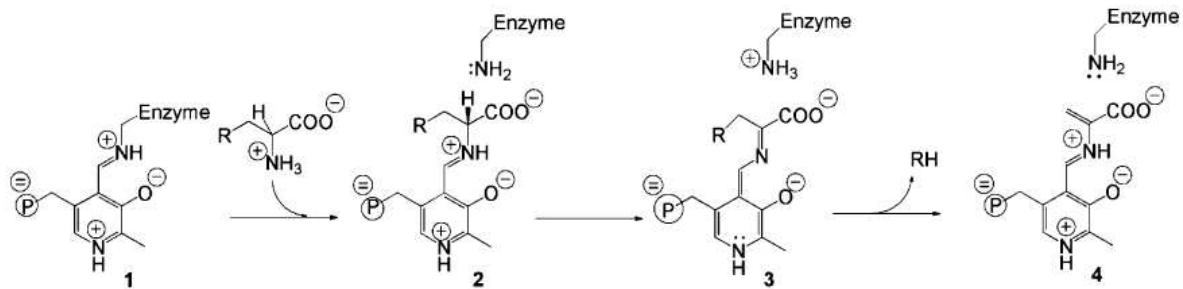


Figure 30 : Formation d'un intermédiaire quinonoïde lors de la réaction de β -élimination telle qu'effectuée par la CBL d'*E. coli*. Les structures 1 à 4 représentent respectivement les étapes aldimine interne, aldimine externe (base de Schiff), quinonoïde et aminoacrylate. RH correspond à l'homocystéine (issu de Aitken et Kirsch, 2005).

En 2014, Hopwood et al. ont eux aussi relevé le défi de l'identification de déterminants de la spécificité de réaction entre les enzymes à PLP structurellement conservées que sont les CGS et CBL. Leur spécificité est vraisemblablement due non pas à un seul résidu, mais à l'interaction de plusieurs résidus qui influencent l'état de protonation du site actif et l'environnement hydrophobe à son entrée. En prenant comme modèles la CGL de *S. cerevisiae* (γ CGL) et la CBL d'*E. coli* (eCBL), les auteurs ont proposé que les différents résidus conservés entourant les positions γ CGL-S334 (E333 et L335) et l'équivalent eCBL-S339 (Y338 et W340) contribuent à la régulation de la spécificité de la réaction. Cela se fait grâce à des interactions qui optimisent les positions relatives du substrat, du cofacteur et de la base catalytique pour moduler les propriétés électroniques du PLP, et permettre ou restreindre l'accès du site catalytique¹⁵⁸. Les résultats de leur étude suggèrent néanmoins que le résidu glutamate E333 est un déterminant de la spécificité de substrat pour la CGL.

Comme nous l'avons vu précédemment, la majorité des enzymes des voies de sulfurylation (sulfhydrylation directe et transsulfuration) sont homologues et appartiennent de plus au groupe structural de type I des enzymes à PLP, ce qui en fait des membres de la famille des aspartates aminotransférases¹⁵¹. La base de données Pfam s'avère très utile pour tenter de discriminer ces protéines.

Cette base de données comprend une large collection de familles de protéines, chacune étant représentée par des alignements de séquences multiples et des modèles de Markov cachés (HMMs pour « hidden Markov models »), modèles statistiques permettant de gagner en sensibilité d'assignation. Les protéines sont généralement composées d'une ou plusieurs régions fonctionnelles, communément appelées domaines. Ce sont les différentes combinaisons de ces domaines qui conduisent à la diversité des protéines trouvées dans la nature. L'identification des domaines présents dans les protéines peut donc donner un aperçu de leur fonction. Pfam génère également des groupes supérieurs de familles Pfam reliées entre elles, appelées clans. Un clan est donc un ensemble d'entrées Pfam qui sont liées par similarité de séquence, de structure ou de profil HMM, et que l'on pourrait assimiler à une superfamille. L'une des philosophies fondamentales de Pfam est que les nouvelles familles de protéines ne doivent pas chevaucher les familles Pfam existantes¹⁵⁹. Ainsi, tout résidu dans une séquence donnée ne peut apparaître que dans une famille Pfam. La construction de nouvelles familles Pfam et / ou la révision de familles existantes met souvent en évidence deux points

importants : d'une part de nombreuses familles Pfam sont apparentées et peuvent avoir des seuils de construction artificiellement élevés afin de les empêcher de se chevaucher ; d'autre part, pour certaines grandes familles divergentes, la construction d'un seul HMM détectant tous les membres de la famille s'avère impossible. C'est donc pour résoudre ces problèmes qu'ont été introduits les clans Pfam.

Ainsi, en prenant les enzymes à PLP impliquées dans la sulfurylation, on constate qu'elles se partagent entre deux types structuraux distincts (tableau 2) : celles des aspartate aminotransférases (type I), que la classification Pfam rassemble au sein du même clan CL0061¹⁶⁰, alors que les cystéine synthases (CS) CysK et CysM, et les cystathionine β -synthases (CBS) MtcB (décrite chez *Klebsiella pneumoniae*¹⁴³, figure 31) et MccA (décrite chez *B. subtilis*¹⁰⁹) de la voie de transsulfuration réverse (biosynthèse de la cystéine à partir de l'homocystéine) appartiennent au même groupe structural de la famille β (type II).

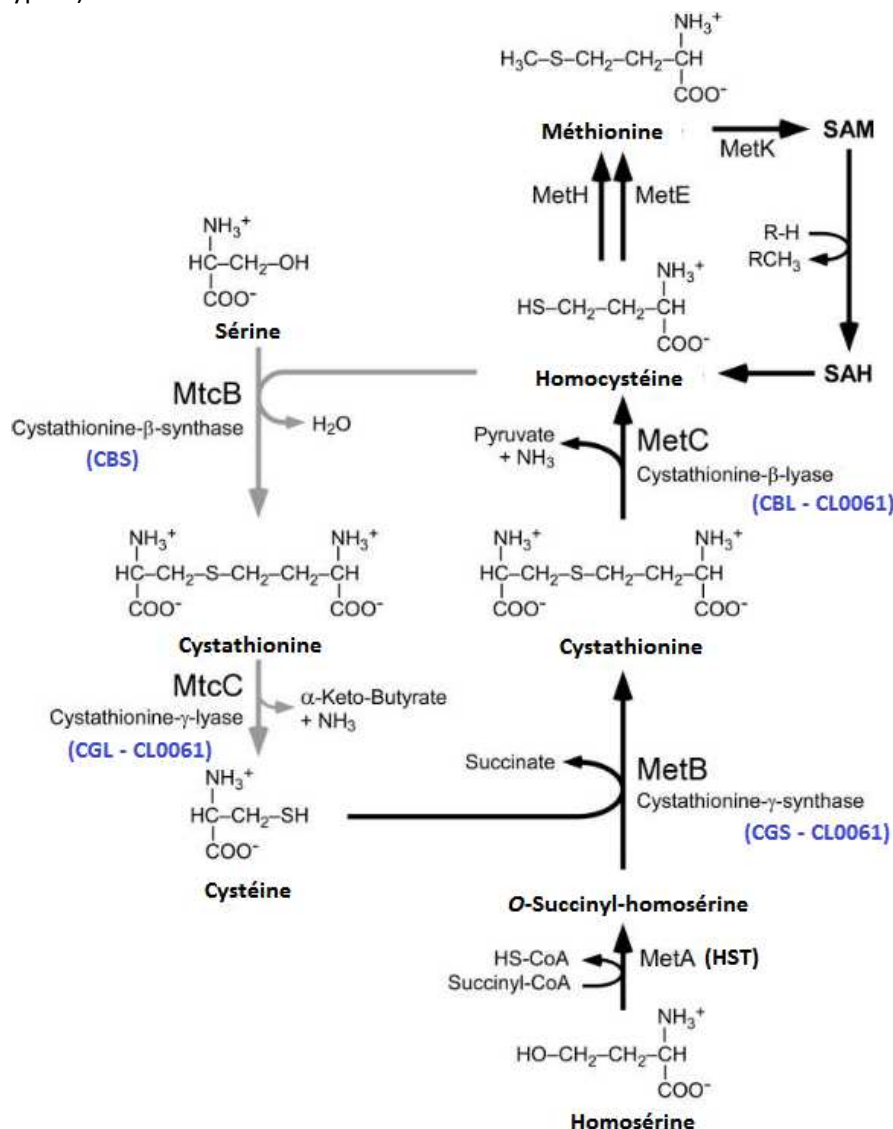


Figure 31 : Voies de transsulfuration chez *K. pneumoniae* W70. Les enzymes MetBC sont impliquées dans la transsulfuration de l'homosérine vers l'homocystéine, précurseur de la méthionine. Les enzymes MtcBC sont impliquées dans la voie de transsulfuration réverse, de la sérine/homocystéine vers la cystéine. SAH, S-adiénosylhomocystéine ; HS-CoA, coenzyme A (modifié de Seiflein & Lawrence, 2006).

Au sein même du clan CL0061, les enzymes des voies de sulfurylation se retrouvent dans deux familles. La principale famille d'enzymes impliquées dans ces voies est la Pfam PF01053, appelée « Cys/Met metabolism PLP-dependent enzyme » dans Pfam¹⁶⁰ et « sous-famille γ » ailleurs¹⁶¹. Les identités de séquence entre les membres de cette famille ayant des fonctions différentes sont relativement faibles (20-30 % d'identité en séquence protéique). Ferla et Patrick ont construit un réseau phylogénétique de séquences représentatives de cette famille (figure 32). Il en découle que plusieurs enzymes ayant la même activité ne sont pas étroitement apparentées. Au lieu de cela, chaque activité enzymatique (β -élimination, γ -substitution et γ -élimination) semble être apparue plusieurs fois au cours de l'évolution⁵⁵.

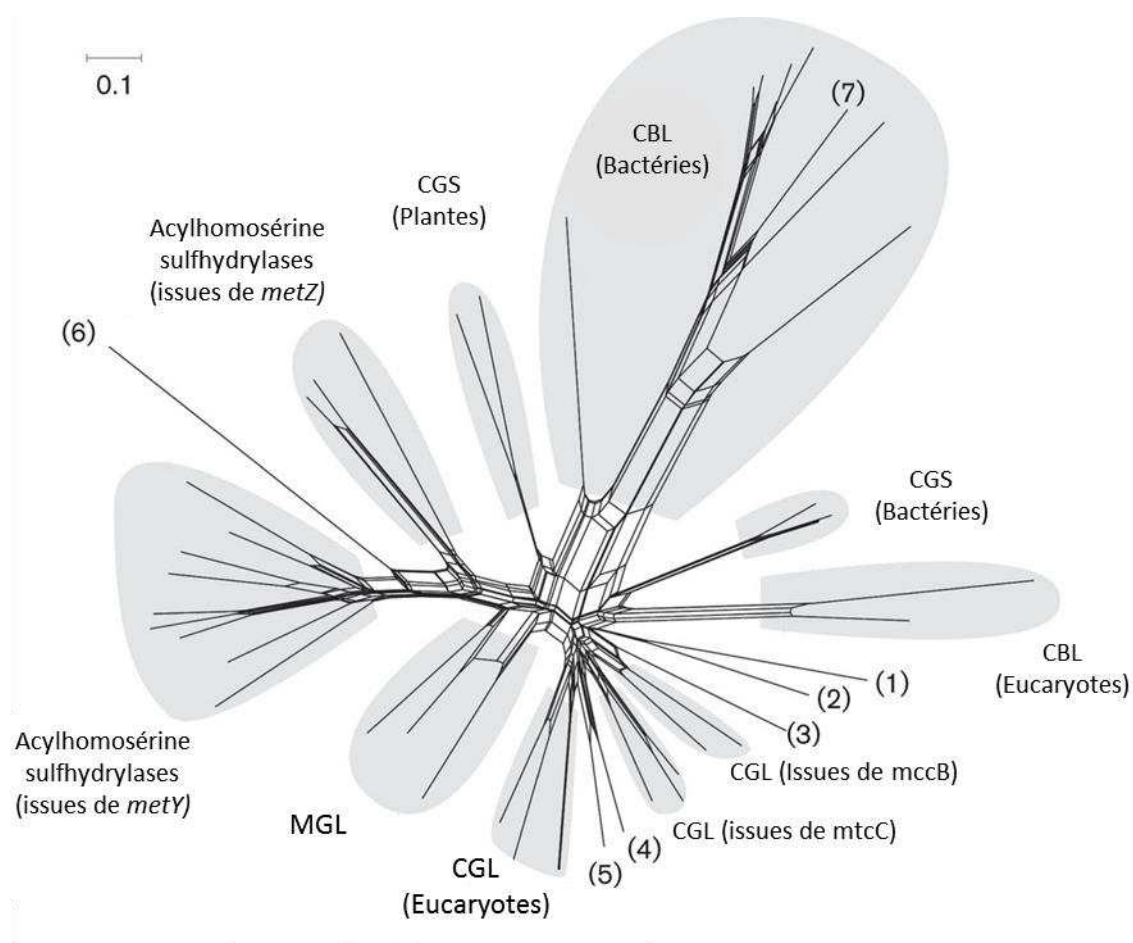


Figure 32 : Réseau phylogénétique protéique de la principale famille d'enzymes impliquées dans les voies de sulfurylation (famille Pfam PF01053)¹⁶⁰. Seuls les principaux groupes (grisés) sont annotés. CGS = cystathionine γ -synthase ; CBL = cystathionine β -lyase ; CGL = cystathionine γ -lyase ; MGL = méthionine γ -lyase. Plusieurs autres clusters sont numérotés, chacun étant représenté par une seule protéine dans cette analyse. Ce sont : (1) la CGL de *Lactobacillus fermentum* (Smacchi & Gobbetti, 1998) ; (2) MetI de *B. subtilis* (Auger et al., 2002) ; (3) la CBL de *B. subtilis* (Auger et al., 2002) ; (4) la CGL de *Mycobacterium tuberculosis* (Saha et al., 2009) ; (5) la CGS de *C. glutamicum* (Hwang et al., 1999) ; (6) l'acétylhomosérine thiolase de *Thermus thermophilus* (Iwama et al., 2004) ; (7) un homologue de la CBL de *Zymomonas mobilis*, fusionnée à un domaine de sulfurtransférase. Cf. référence pour méthodologie (issu de Ferla & Patrick, 2014).

Dans le cas des CBL (MetC), l'activité de β -élimination est vraisemblablement apparue dans trois lignées différentes (figure 32). Un des groupes de séquences est composé de la plupart des enzymes bactériennes, un second contient des séquences eucaryotes et un troisième contient la séquence de *B. subtilis*. Les autres groupes de la figure incluent des enzymes qui agissent sur le carbone γ , mais pour chaque activité (CGS, CGL et acylhomosérine sulfhydrylases) les séquences ne sont pas regroupées phylogénétiquement dans des groupes uniques. Les CGL se divisent en trois groupes distincts similaires à MtcC de *K. pneumoniae*, à MccB de *B. subtilis* et le troisième avec les séquences de CGL eucaryotes. De même, les CGS bactériennes (MetB) sont regroupées à l'opposé des CGS issues de plantes et utilisant l'*O*-phosphohomosérine.

La famille Pfam PF00155¹⁶⁰, moins importante que la précédente, contient trois enzymes pour lesquelles une activité CBL plus ou moins forte a été démontrée. Parmi ces enzymes déjà mentionnées précédemment, seule AecD/MetC de *C. glutamicum* semble agir physiologiquement comme une CBL¹⁰⁷, contrairement à PatB (*B. subtilis*)¹¹⁵ et MalY impliqué physiologiquement dans le métabolisme du maltose chez *E. coli*¹¹². Pour rappel, chez *B. subtilis* et *E. coli*, le mutant $\Delta metC$ est auxotrophe à la méthionine mais la surexpression de PatB et MalY complémente l'absence de MetC chez ces deux bactéries, respectivement.

Dans l'ensemble, ces données démontrent la plasticité phylogénétique des enzymes à PLP de groupe I impliquées dans les voies de sulfurylation, que ce soit pour des réactions de β - ou γ -éliminations ou de γ -substitutions. Malgré cela, les différentes approches de mutagenèse rationnelle appliquées à ces enzymes ont jusqu'ici échoué à faire converger leurs activités respectives^{162,163}. En outre, du fait que la sulfhydrylation directe constitue la voie la plus courte pour la biosynthèse de l'homocystéine (voire même directement de la méthionine lorsque le méthanethiol est disponible), il est probable que le gène ancestral codait pour une *O*-acétylhomosérine sulfhydrylase, comme l'ont proposé Hacham et al. (2003)⁶⁹ et Aitken & Kirsch (2005)¹²⁷. Leur hypothèse est notamment renforcée par l'observation que les CGS d'*E. coli* et d'*A. thaliana* possèdent la capacité résiduelle d'accepter le sulfure d'hydrogène (au lieu de la cystéine), et ainsi de catalyser la sulfhydrylation directe à de faibles niveaux.

Le nombre croissant d'annotations résultant d'une prédiction d'activité protéique par simple homologie de séquences, en lien avec le nombre croissant de projets de séquençage génomique, nécessite le développement de méthodes permettant de prévoir les diverses spécificités fonctionnelles des enzymes à PLP, entre autres. La création de la base de données B6 de l'Université de Parme à la fin des années 2000 (<http://bioinformatics.unipr.it/B6db>) inventorie 236 activités différentes dont 191 sont reliées à un numéro EC¹⁴⁴. La comparaison de protéines PLP-dépendantes nouvellement séquencées avec une collection vérifiée de familles de protéines, rendant plus fiable une classification fonctionnelle préliminaire. Ce type de base de données aide également à identifier les produits géniques les plus intéressants pour des études fonctionnelles. En raison des progrès de la génomique fonctionnelle, ainsi que des approches biochimiques et génétiques classiques, le corpus d'informations sur les enzymes à PLP va nécessairement augmenter. De nombreuses activités qui sont actuellement «orphelines» (c'est-à-dire sans enzymes affiliées) seront associées à des séquences spécifiques, alors que de nombreuses nouvelles activités sont susceptibles d'être découvertes¹⁴⁵.

Plus spécifiquement, pour l'assignation de fonction des enzymes MetZ, MetB et MetY impliquées dans les voies de transsulfuration et de sulfhydrylation directe, une étude systématique vis-à-vis de l'*O*-acétylhomosérine (OAH) ou de l'*O*-succinylhomosérine (OSH) de l'ensemble de ces enzymes dans le vivant et leur capacité catalytique (OASH, OSSH, CGS, CD, CBL...), permettrait peut-être, comme ce qui a été réalisé au laboratoire pour les familles MetX et MetA, d'affiner les prédictions de spécificité de substrat. En attendant, le recoupement des informations avec la prédiction du produit formé par l'étape précédente pourrait cependant assez simplement permettre d'affiner la détermination du type de substrat potentiellement utilisé.

1.2.3 Synthèse de la méthionine depuis l'homocystéine

Alors qu'il existe plusieurs alternatives pour la biosynthèse de l'homocystéine lors de l'étape de sulfurylation (par transsulfuration ou sulfhydrylation directe), l'étape finale de la biosynthèse de la méthionine, c.-à-d. la *S*-méthylation de l'homocystéine, est hautement conservée. Deux méthionine synthases, MetE (enzyme cobalamine/vitamineB12-indépendante, familles InterPro IPR013215 et IPR022921) et MetH (enzyme cobalamine/vitamineB12-dépendante, familles InterPro IPR017215 et IPR011822). Chez de nombreuses bactéries comme chez *E. coli*, ces deux enzymes sont présentes en simultanée. Cependant, certaines espèces n'en possèdent qu'une⁵⁵. C'est le cas de *H. influenzae*, qui ne possède que MetE, tandis que chez *L. meyeri* seul MetH est présent⁶¹. Les deux enzymes sont des méthyltransférases, leur dépendance ou non à la [cobalamine/vitamineB12] étant leur principale caractéristique.

MetH catalyse d'abord le transfert de méthyle de la méthylcobalamine liée à l'enzyme vers l'homocystéine pour générer de la méthionine d'une part et de la cob(I)alamine d'autre part¹⁶⁴. Du méthyltétrahydrofolate est ensuite utilisé pour reméthyliser la cob(I)alamine, régénérant ainsi la méthylcobalamine et produisant du tétrahydrofolate. MetH peut tout aussi bien prendre en charge les formes mono- et tri-glutamate du folate, tandis que MetE ne peut utiliser que la forme triglutamate¹⁶⁵. Le cofacteur cobalamine sert ainsi à la fois d'accepteur et de donneur du groupement méthyle. En outre, l'hypothèse émise par Rückert et al. serait que MetH et MetE peuvent être utilisés selon différentes conditions de croissance¹⁰⁷. Il est intéressant de noter que chez *E. coli*, la réaction catalysée par MetH (B12-dépendante) est plus de 100 fois plus rapide que la réaction catalysée par l'isoenzyme MetE (B12-indépendante)¹⁶⁶. Finalement, le cycle recommence avec la régénération de la SAM (donneur de méthyle) par la SAM synthase.

Chez *E. coli*, l'expression de l'ensemble du cluster de gènes *met*, à l'exception du gène *metH*, est réprimée par la méthionine exogène. En effet en présence de méthionine dans le milieu, l'expression de l'apo-répresseur MetJ (*i.e.* d'un répresseur ne se fixant sur un opérateur qu'en présence de son co-répresseur), Uniprot ID : POA8U6, est responsable de cette répression génique après activation par sa liaison à la SAM (et à la méthylthioadénosine)¹⁶⁷. Le régulateur positif MetR (MetR_{coli}, Uniprot ID : POA9F9) est quant à lui impliqué dans l'activation des méthionine synthase MetE et MetH. Lorsque la liaison de MetR à l'ADN est perturbée, l'activité de MetE est altérée¹⁶⁸. Diverses études ont montré par ailleurs que la méthionine peut réprimer les niveaux d'expression des enzymes à différents niveaux dans sa voie de biosynthèse : sont ainsi impactées les enzymes impliquées dans l'activation de l'homosérine (MetX-HAT/HST), la production de cystathionine (les CGS), et la synthèse

de l'homocystéine (via les CBL et les OAHS/OSHS)^{95,124,169,170}. Enfin, comme évoqué précédemment, il a été démontré que les enzymes MetA-HST d'*E. coli* et MetX-HAT de *H. influenzae* et *Paenibacillus polymyxa* étaient inhibées par feedback négatif par la méthionine et/ou la SAM^{56,67,171}.

Une variation mineure dans la formation de l'homocystéine existe cependant chez les cyanobactéries : plusieurs espèces de *Synechocystis*¹⁷², ainsi que *Spirulina platensis*¹⁷³, utilisent en effet de l'adénylcobamide (pseudo vitamine B12) comme cofacteur de la méthionine synthase MetH à la place de la cobalamine. Structuellement, l'adénylcobamide diffère de la cobalamine par son groupement axial, qui est un fragment adéninyle, par opposition au motif ribonucléotide 5,6-diméthylbenzimidazole des MetH classiques (figure 33).

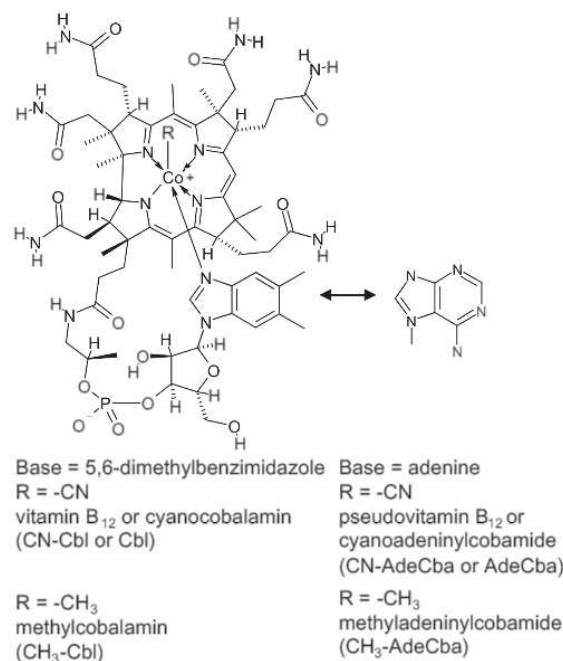


Figure 33 : Structure de la cobalamine et de ses dérivés. Seules les parties variables ont été indiquées sur ce schéma (issu de Tanokia et al., 2010).

Une autre voie de méthylation indépendante du 5-méthyltétrahydrofolate et du 5-méthyl-tétrahydroptéryle tri-glutamate est également connue. Il s'agit de l'enzyme bêtaïne-homocystéine S-méthyltransférase (famille InterPro IPR017226, codée par *bhmT* ou *gbt*), appelée aussi méthionine synthase MetH₂ (EC 2.1.1.5), qui provient du catabolisme de la choline et catalyse la conversion de la bêtaïne et de l'homocystéine en diméthylglycine et en méthionine. Le gène de cette transméthylase est connu pour être présent en même temps que *metE* et *metH* chez *P. aeruginosa* (*Gbt*_{aeruginosa}, Uniprot ID : Q9HZC6)¹⁷⁴ et chez *Sinorhizobium meliloti*¹⁷⁵. Il est d'ailleurs connu pour offrir la seule voie de biosynthèse de la méthionine à *Oceanobacillus iheyensis*¹⁶⁶ et à *Pelagibacter ubique*¹⁷⁶ ; cependant son occurrence reste assez rare.

1.3 Utilisation de la méthionine dans le métabolisme synthétique

On estime que seulement 20 % environ du réservoir de L-méthionine est intégré dans les protéines¹⁷⁷. Le reste est notamment converti en S-adénosyl-L-méthionine ou SAM (dont une des fonctions est d'être le principal donneur de méthyle dans la cellule) ou stocké sous forme mono- ou di-oxydée (méthionine sulfoxyde et méthionine sulfone respectivement). En outre, selon les organismes, la méthionine peut également être recyclée en cystéine soit par la voie de transsulfuration réverse (aussi considérée comme une des voies de biosynthèse de la cystéine chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* par exemple), soit par la voie des sulfites (SO₃²⁻) et/ou du sulfure d'hydrogène (H₂S). La description à la fois du cycle comprenant la biosynthèse de la SAM (ainsi que les voies associées, comme la biosynthèse de la S-méthyl-5'-thioadénosine (MTA) ou celle des polyamines...) et des voies de recyclage de la méthionine permet ainsi d'avoir une vue globale des voies métaboliques reliant les deux acides aminés soufrés essentiels de la cellule que sont la méthionine et la cystéine.

1.3.1 Le cycle du méthyle activé (AMC) et ses dérivés

Comme nous l'avons vu en préambule, la méthionine ne sert pas seulement de composant de la chaîne d'acides aminés des protéines ; elle est aussi utilisée comme précurseur de synthèse de la S-adénosylméthionine, molécule souvent désignée sous les acronymes SAM ou AdoMet. La SAM est un important agent alkylant, également un donneur de propylamine, et constitue un radical pour de nombreuses protéines ; les enzymes à radical SAM utilisent en effet le pouvoir oxydant du radical 5'-déoxyadénosyl afin d'initier un large spectre de transformations biochimiques, dont des méthylation, des isomérisations, l'insertion de soufre, la formation de cycles, l'oxydation anaérobie, etc...¹⁷⁸. Ainsi les méthyltransférases à radical SAM permettent de méthyler une grande variété de substrats (acides aminés, acides nucléiques, sucres, polysaccharides, lipides) pour former des produits de réaction tout aussi divers (méthyl-esters, -éthers, -thioéthers, sulfure de méthyle (DMS), méthyl-amines ou -amides). Les biosynthèses de la cystéine, de l'éthylène chez certaines bactéries et des polyamines sont également liées au cycle de la SAM comme nous allons le voir. Cette diversité fait du cycle AdoMet ou cycle du méthyle activé un élément central du métabolisme du soufre.

1.3.1.1 Cycle de la S-adénosylméthionine (SAM) ou cycle AdoMet

La méthionine est essentielle à la biosynthèse de la S-adénosylméthionine ou SAM (figure 34) et constitue ainsi la porte d'entrée du cycle du méthyle activé (AMC pour « activated methyl cycle » - figure 35).

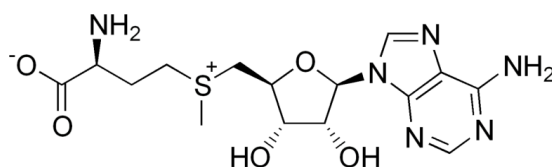


Figure 34 : Structure de la S-adénosylméthionine (SAM)

L'unique voie de biosynthèse de la SAM est régie par la *S*-adénosylméthionine synthase (ATP: L-méthionine *S*-adénosyltransférase ; EC 2.5.1.6). Cette enzyme catalyse la formation du composé sulfonium SAM à partir de méthionine et d'ATP. Cette réaction est inhabituelle par le fait que l'intégralité de la chaîne triphosphosphate issue de la molécule d'ATP est clivée, celle-ci étant ensuite dégradée en pyrophosphate (PPi) et phosphate (Pi) avant que les produits de réaction ne soient libérés¹⁷⁹. Chez *E. coli*, *B. subtilis* ou encore *Helicobacter pylori*, cette enzyme est codée par le gène *metK*, bien que l'on puisse également trouver le synonyme *metX* chez *E. coli* (*MetK_{coli}*, Uniprot ID : P0A817) où ce gène a été considéré un temps comme différent de *metK* (et codant pour une seconde SAM synthase) alors qu'il y était en réalité identique^{180,181}. *MetK* est composée d'un dimère d'homodimères et est active seulement sous sa forme tétramérique^{182,183}. L'expression de *MetK* est régulée par *MetJ*¹⁸⁴ et la transcription du gène *metK* est notamment induite lors de la formation de biofilms¹⁸⁵. Diverses structures cristallographiques ont été obtenues de *MetK*, confirmant son oligomérisation et montrant que ses sites actifs sont localisés à l'interface des dimères¹⁸⁶. Chez *B. subtilis* il a été démontré que l'enzyme *MetK* (Uniprot ID : P54419) était par ailleurs stabilisée par des interactions non-covalentes requérant des cations divalents (Mg^{2+}) et stimulée par des ions monovalents (K^+)¹⁸⁷. Chez *E. coli*, les sites et les mécanismes catalytiques mis en jeu lors de la réaction ont été très étudiés, donnant lieu à plus d'une quinzaine de publications. Cet intérêt est notamment dû au fait que *metK* est un gène essentiel, car impliqué dans une multitude de mécanismes parfois critiques comme la division cellulaire (une réaction de méthylation est par exemple nécessaire à l'assemblage de l'anneau impliqué dans la formation du septum de division entre deux cellules filles)¹⁸⁸. *MetK* constitue ainsi une cible de choix pour le développement de composés antimicrobiens, voire d'anticancéreux : il a en effet été démontré lors d'une étude sur les facteurs de virulence de *H. pylori* que cette enzyme constitue un antigène majeur en corrélation avec le cancer de l'estomac¹⁸⁹.

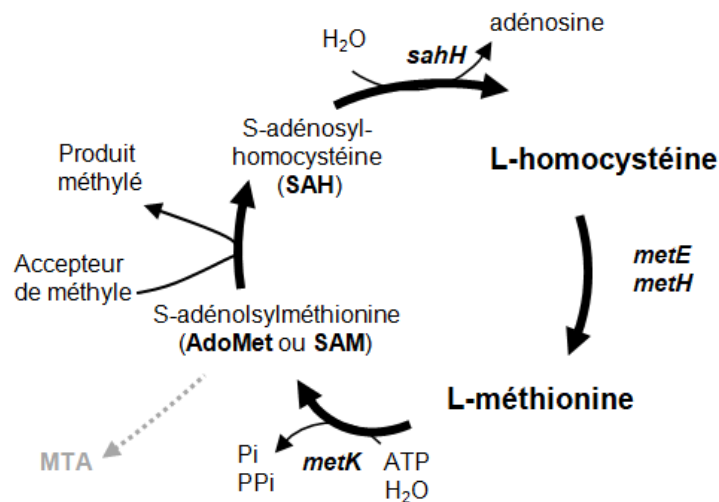


Figure 35 : Cycle « AdoMet » ou cycle du méthyle activé commun aux procaryotes et à certains eucaryotes. Chez les bactéries, la biosynthèse du MTA à partir de la SAM (AdoMet) s'accompagne de la formation de polyamines et/ou d'autoinducteurs.

Une fois la SAM synthétisée, celle-ci peut être utilisée de deux manières (figure 36) : soit elle reste dans le cycle AdoMet, où la SAM est alors convertie en *S*-adénosyl-L-homocystéine (SAH), produit des réactions de méthylation effectuées via la SAM. Soit elle rentre dans le cycle de Yang, cycle découvert au début des années 1980s et permettant notamment la synthèse de l'éthylène chez les

plantes^{190,191}. Ce cycle est plus connu chez les bactéries sous le nom de voie de recyclage de la méthionine (« methionine salvage pathway ») ou encore cycle du MTA (pour 5'-méthylthioadénosine), le MTA étant un co-produit de la biosynthèse des polyamines chez les bactéries et les plantes¹⁹² via l'enzyme SpeE, une polyamine aminopropyltransférase (voir figure 36 et section 1.3.1.2.).

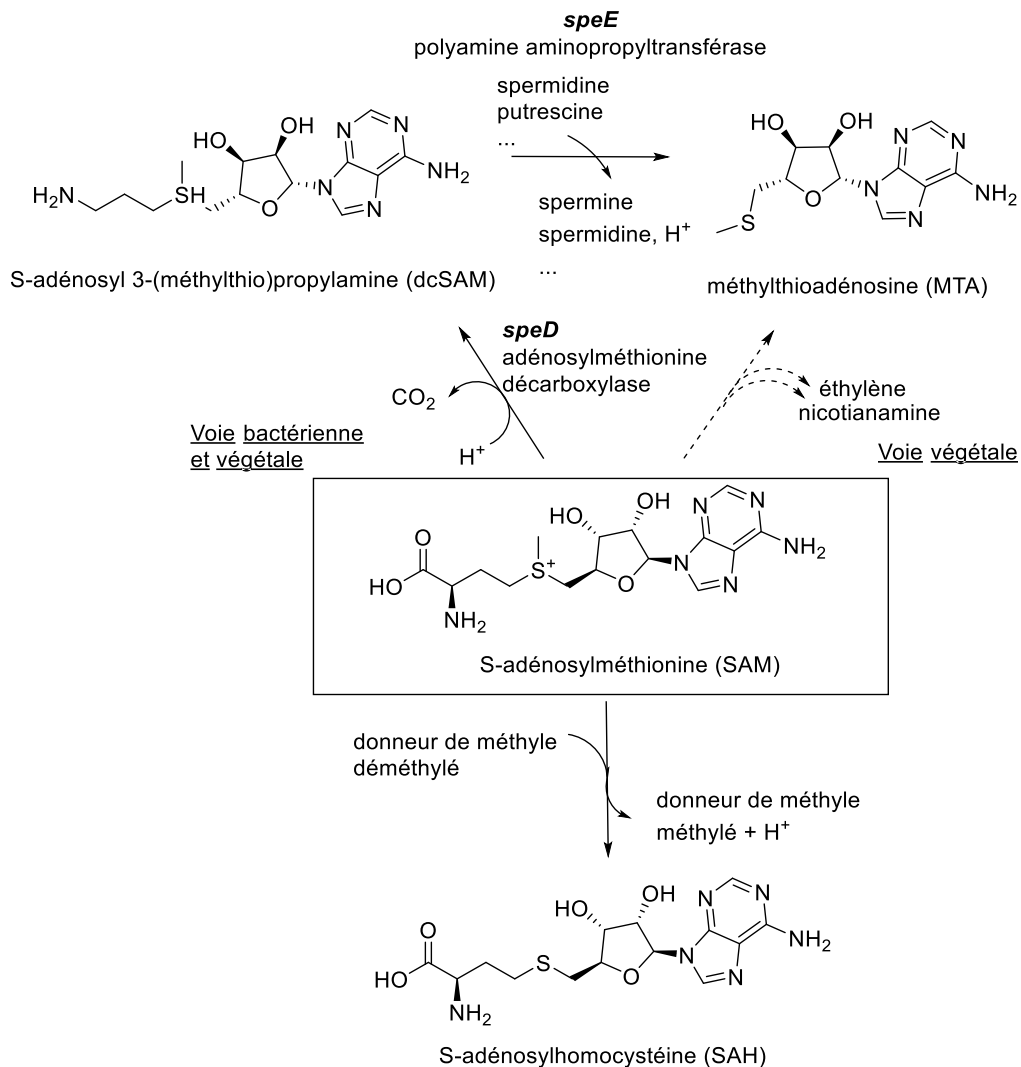


Figure 36 : Utilisation de la SAM dans le métabolisme bactérien. La SAM peut être exploitée soit dans le cadre du cycle AdoMet (bas de la figure) soit dans le cadre du cycle de Yang (haut de la figure). À noter que la voie permettant la formation directe du MTA à partir de la SAM n'a été décrite que chez les végétaux ; elle y permet notamment la biosynthèse de l'éthylène ou encore de la nicotianamine.

Chez les bactéries, il existe deux voies au sein même du cycle AdoMet depuis la formation de SAH vers la biosynthèse de la L-homocystéine (figure 37) : l'une se déroule en deux étapes réactionnelles et est appelée voie Pfs(MtnN) / LuxS ; l'autre ne comporte qu'une étape réactionnelle et a été nommée voie SahH car elle est régulée par l'enzyme S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase (SahH).

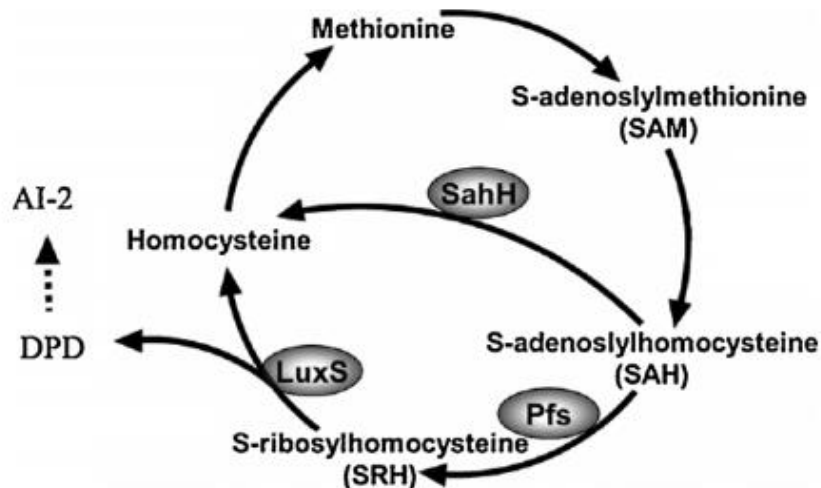


Figure 37 : Voies bactériennes du cycle AdoMet ou cycle du méthyle activé. La voie Pfs(MtnN)/LuxS permet la biosynthèse de l'autoinducteur AI2 (issu de Xu et al., 2017).

La plupart des bactéries, dont *E. coli*, utilisent la voie Pfs(MtnN)/LuxS : lors de la 1^{ère} étape, une MTA/SAH nucléosidase nommée Pfs (ou MtnN ou YadA, Uniprot ID : P0AF12) permet la conversion de la SAH en *S*-ribosylhomocystéine (SRH). Puis LuxS (Uniprot ID : P45578), une *S*-ribosylhomocystéine lyase, catalyse la conversion de la SAH en L-homocystéine et 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD), précurseur de synthèse de l'autoinducteur AI-2^{193,194}. Les autoinducteurs sont de petites molécules diffusibles, à concentration proportionnelle à la concentration bactérienne, qui entraînent l'induction de l'expression de certains gènes ; ces molécules semblent ainsi déterminantes dans le phénomène de détection de quorum sensing (QS), terme générique utilisé pour qualifier tout processus de communication impliquant des molécules diffusibles produites constitutivement par les bactéries. Cependant, le manque de preuves génomiques concernant les récepteurs d'AI-2 suggère que *luxS* n'aurait pas toujours un rôle de QS chez les bactéries possédant cette voie, réduisant alors AI-2 au simple rôle de déchet non toxique excrété^{195,196}.

La voie SahH, décrite chez *Mycobacterium tuberculosis*¹⁹⁷ ou encore *Pseudomonas aeruginosa*¹⁹⁸, se déroule quant à elle en une étape (figure 37) via l'hydrolyse de la SAH médiée par la *S*-adénosyl-L-homocystéine hydrolase (SahH). Cette étape complète le cycle AdoMet en régénérant de la L-homocystéine ainsi que de l'adénosine sans production d'AI-2. SahH joue donc un rôle décisif dans la régulation des niveaux cellulaires en adénosine et SAH, et, influe indirectement sur les réactions de transméthylation¹⁹³. De plus, alors que la réaction catalysée par cette enzyme est réversible, l'équilibre favorise la synthèse de SAH. Ainsi, l'élimination du produit d'hydrolyse, *i.e.* la L-homocystéine, est critique pour le fonctionnement continu du cycle.

Par la suite, le cycle se poursuit comme nous l'avons vu avec la méthylation de la L-homocystéine en L-méthionine via un groupement méthyle provenant d'un folate méthylé, réaction catalysée par la méthionine synthase MetE ou Meth.

1.3.1.2 AdoMet (SAM) et le cycle de Yang : biosynthèse du 5'-Méthylthioadénosine (MTA), de polyamines et de méthionine

La SAM sert de donneur de méthyle pour un grand nombre de réactions mais peut également être utilisée comme précurseur de synthèse des polyamines (spermidine, spermine...) comme nous l'avons évoqué précédemment. En effet, le dérivé décarboxylé de la SAM, la S-adénosyl 3-(méthylthio)propylamine (ou dcSAM), obtenu par action de la SAM décarboxylase SpeD (figure 36), constitue un donneur de propylamine ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) utile pour la synthèse de composés polyaminés. La synthèse de ces polyamines entraîne la formation d'un sous-produit, le méthylthioadénosine (MTA) qui va être éliminé car toxique et inhibiteur du cycle de Yang, ou bien être recyclé notamment en L-méthionine ou H_2S . Le MTA, via la formation de l'acide 2-oxo-4-méthylthiobutyrique ou KMBA (parfois aussi nommé KMTB) dans le cycle de Yang, aboutit également à la biosynthèse du diméthylsulfoniopropionate (DMSP), molécule produite notamment par les plantes, les algues et le phytoplancton¹⁹⁹. Celle-ci peut être ensuite métabolisée par les bactéries et constitue par conséquent, une fois convertie en molécule plus volatile comme le sulfure de diméthyle (DMS), une importante source de soufre atmosphérique, jouant ainsi un rôle essentiel dans le cycle global du soufre. Le DMSP et le DMS, produit de dégradation du DMSP, sont des acteurs clés du climat comme nous le verrons. Compte tenu de l'importance du DMSP, la synthèse de cette molécule ainsi que les voies d'assimilation par les bactéries seront exposées dans cette partie.

- Biosynthèse des polyamines et production de MTA

Les polyamines, dont les plus communes sont la putrescine, la spermidine et la spermine (figure 38), forment un groupe de polycations organiques (les charges positives étant portées par les fonctions amines), impliqués dans de nombreux processus biologiques, incluant l'expression génique, la croissance et la prolifération cellulaire, ou bien encore la survie et la réponse aux stress²⁰⁰, et ce via diverses actions (liaison aux acides nucléiques, stabilisation des membranes, amélioration de l'activité enzymatique, ...) ²⁰¹⁻²⁰⁴. Alors qu'il est clair que les polyamines sont essentielles pour une croissance cellulaire normale, leurs fonctions moléculaires spécifiques *in vivo* ne sont cependant pas encore complètement élucidées.

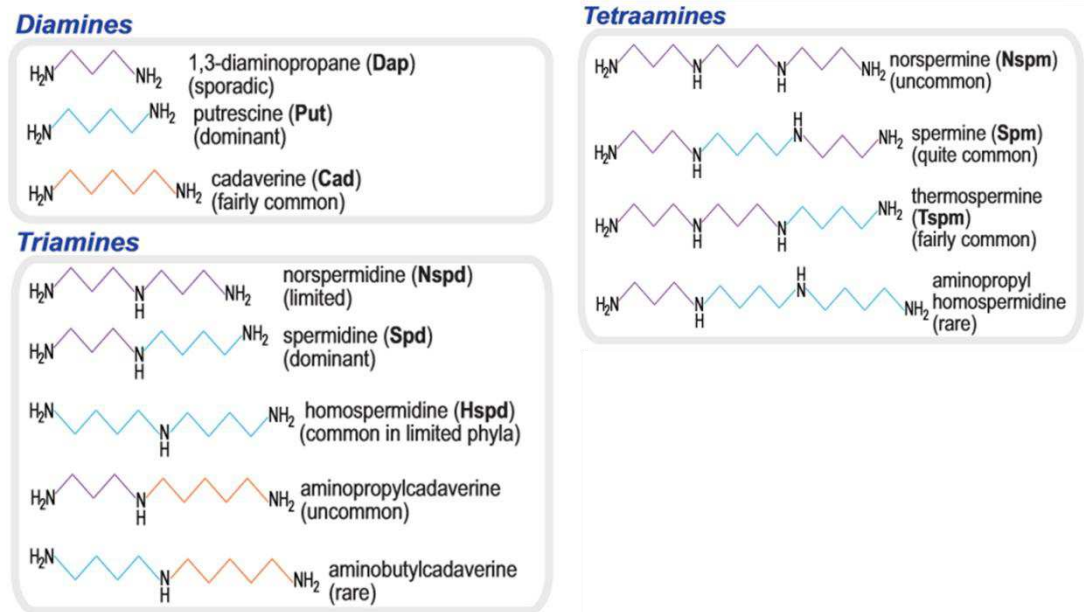


Figure 38 : Polyamines des classes des diamines, triamines et tétraamines trouvées chez les eucaryotes, les bactéries et les archées. La putrescine est une diamine, la spermidine une triamine et la spermine une tétraamine (issu de Michael et al., 2016).

Parmi les plus connues, la putrescine et la spermidine sont présentes dans toutes les formes de vie, tandis que la spermine se trouve principalement chez les eucaryotes. Les quelques bactéries chez lesquelles la présence de spermine a été rapportée incluent *P. aeruginosa*²⁰⁵ et *Geobacillus stearothermophilus*²⁰⁶.

Au moins trois voies différentes menant à la formation de spermidine ont été décrites, mais nous nous intéresserons ici uniquement aux deux voies impliquant la SAM. La plus répandue, la voie SpeDE (cf. « voie bactérienne » de la figure 36), est retrouvée chez de nombreuses bactéries, ainsi que la plupart des archées et eucaryotes. Après action de la décarboxylase SpeD à pyruvoyl ($\text{CH}_3\text{-CO-CO-}$; EC 4.1.1.50) sur la SAM et obtention de SAM décarboxylée, la dcSAM donne son groupement aminopropyle à la putrescine sous l'action d'une polyamine aminopropyltransférase SpeE (également appelée spermidine synthase), générant alors la spermidine et la S-méthyl-5'-thioadénosine (MTA)²⁰⁴. La spermine est générée de la même manière, l'enzyme SpeE prenant alors la spermidine comme substrat au lieu de la putrescine.

La seconde voie incluant également la SAM et son dérivé dcSAM a été décrite chez des bactéries hyperthermophiles et des archées sur la base d'analyses génomiques et fonctionnelles impliquant la N^1 -(3-aminopropyl)agmatine comme intermédiaire clef²⁰⁷. Dans cette voie (figure 39), la L-arginine est décarboxylée en agmatine (qui est également un précurseur de la putrescine utilisée dans les autres voies de biosynthèse de la spermidine). La dcSAM donne ensuite un groupement aminopropyle à l'agmatine via une agmatine aminopropyltransférase pour former la N^1 -(3-aminopropyl) agmatine et le MTA. La N^1 -(3-aminopropyl) agmatine subit ensuite une hydrolyse via une aminopropylagmatine uréohydrolase, conduisant à la production de la spermidine. Des expériences de disruption génique et l'analyse fonctionnelle de l'expression d'enzymes recombinées ont suggéré que la bactérie thermophile *Thermus thermophilus* HB8 utilise uniquement cette voie.

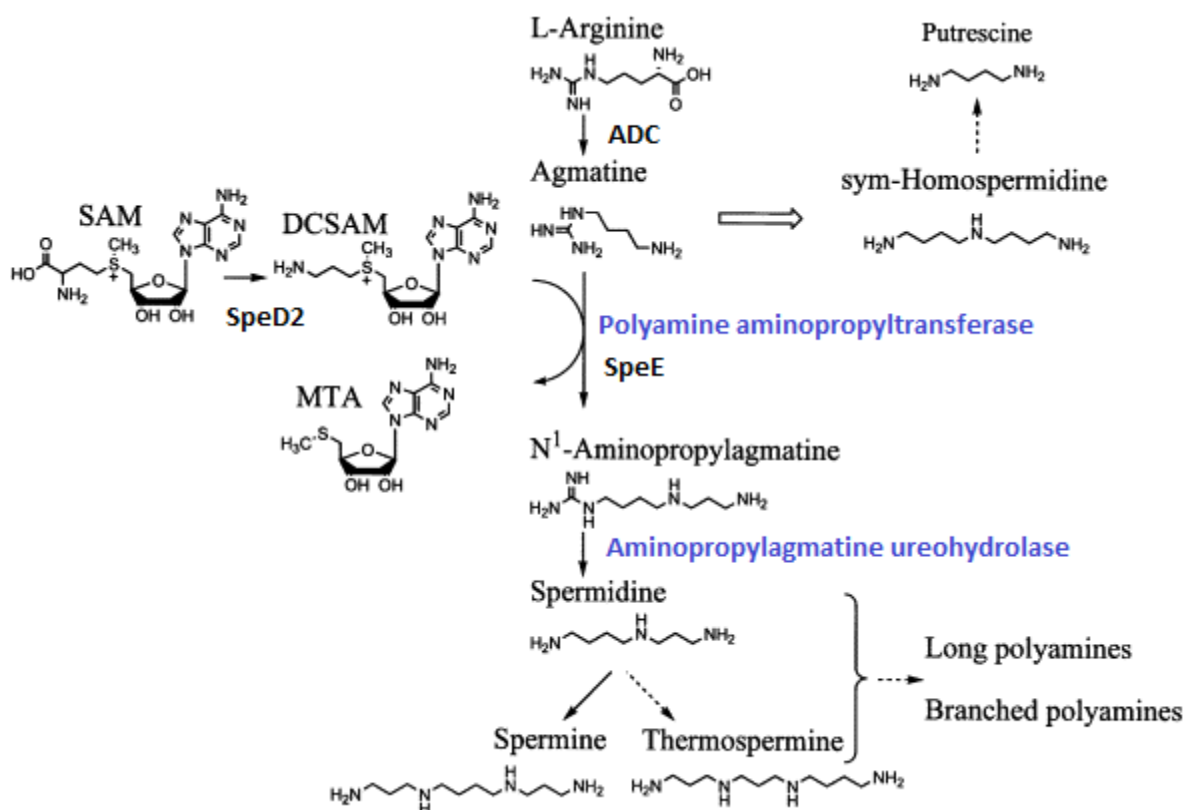


Figure 39 : Voie de biosynthèse de polyamines chez la bactérie *Thermus thermophilus*. Les chemins indiqués par des flèches pointillées ne sont pas encore élucidés. Le chemin indiqué par une flèche blanche est prédit par l'annotation automatique. ADC, arginine décarboxylase ; SAM, S-adénosylméthionine ; DCSAM, SAM décarboxylée ; MTA, méthylthioadénosine (issu de Tairo Oshima, 2010).

Des études similaires suggèrent que l'archée hyperthermophile *Thermococcus kodakarensis* KOD1 utilise principalement cette voie, mais aussi la voie SpeHE²⁰⁸ (figure 40), voie équivalente à SpeDE chez *E. coli* (à noter qu'*E. coli* peut également synthétiser directement la putrescine via la décarboxylation de l'ornithine). Bien que la SAM décarboxylase SpeD ne soit pas conservée chez ces deux organismes, des études fonctionnelles chez *T. thermophilus* ont confirmé (selon l'auteur) son identité en tant que SpeD2 (TTHA1457, Uniprot ID : Q5SIB7)²⁰⁹. Par ailleurs chez cet organisme, la spermidine est également un intermédiaire clé dans la synthèse de polyamines uniques, à chaîne longue ou ramifiées, qui peuvent être importantes pour la vie à haute température : ce sont notamment la caldopentamine, la tris(3-aminopropyl)amine et le tetrakis(3-aminopropyl) ammonium. Ces polyamines ont également été suggérées comme étant un marqueur chimiotaxonomique dans la systématique bactérienne^{210,211}. Cependant, les enzymes impliquées dans leur synthèse n'ont pas encore été identifiées²¹².

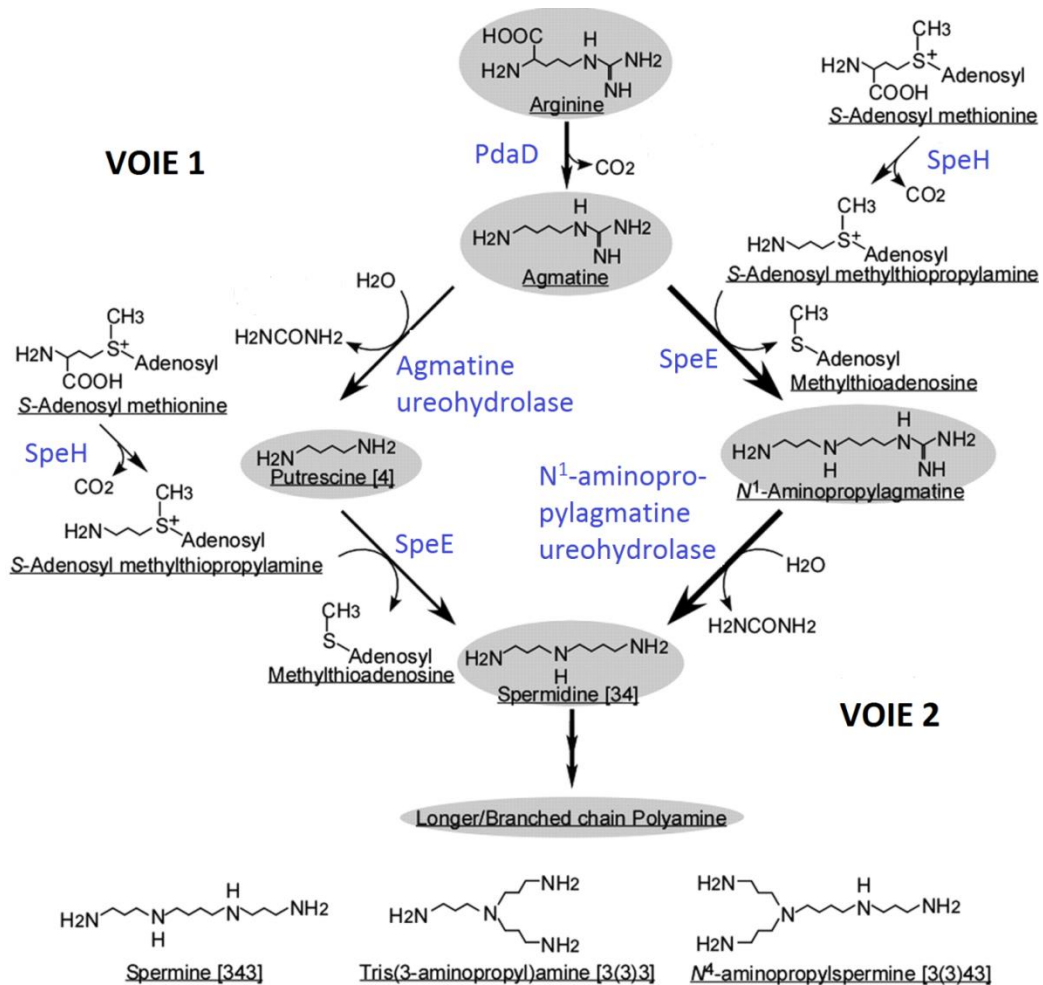


Figure 40 : Voies de biosynthèse des polyamines chez l'archaee *Thermococcus kodakarensis*. PdaD, arginine décarboxylase pyruvoyl-dépendante ; SpeH, S-adenosylméthionine décarboxylase pyruvoyl-dépendante ; SpeE, aminopropyl transférase (modifié de Morimoto et al., 2010).

- Biosynthèse de *N*-acyl-homosérine lactones et production de MTA

Les *N*-acyl-homosérine lactones (AHLs) sont des molécules signales faisant partie du système de quorum sensing des bactéries (système de communication qui permet de synchroniser l'expression des gènes d'une population). Le MTA peut aussi être, chez les bactéries Gram négatives, un co-produit de synthèse de la production d'autoinducteurs de type acyl-homosérine lactones (AHL) via l'action de *N*-acétylhomosérine lactone synthases. La synthèse de ces AHLs est réalisée via le système LuxI / Pfs (figure 41), notamment chez *Vibrio* où la première réaction catalysée par LuxI co-produit du MTA^{213,214} (LuxI de *Vibrio fischeri*, Uniprot ID : P35328).

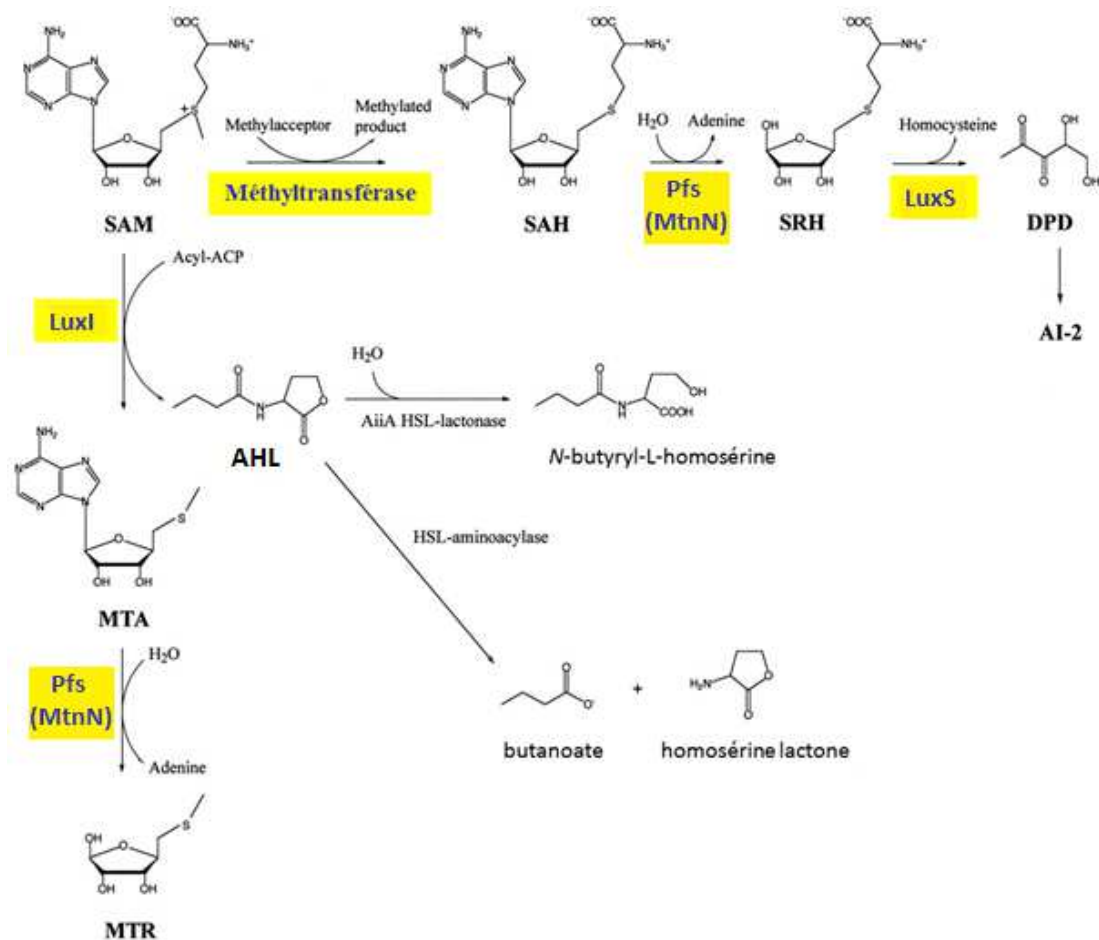


Figure 41 : Voies de biosynthèse des autoinducteurs bactériens AI-1 (acyl-HSL) et AI-2 à partir de la SAM. SAH, S-adénosylhomocystéine ; SRH, S-ribosylhomocystéine ; DPD, 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione ; AI2, Auto-inducteur-2 ; MTA, méthylthioadénosine ; MTR, S-méthyl-5-thio-D-ribose ; ACP, Acyl carrier protein ; AHL, N-butyryl-L-homosérine lactone (modifié de Winans & Bassler, 2002).

- Cycle de Yang ou cycle du MTA, recyclage du MTA en L-méthionine

Le MTA est donc le sous-produit commun des réactions de biosynthèse décrites ci-dessus. Son accumulation inhibe les polyamine synthases et les méthyltransférases²¹⁵, et peut donc avoir un effet toxique chez les organismes où ces polyamines sont essentielles au bon fonctionnement de la cellule. Il est donc important d'avoir une régulation fine du niveau de MTA intracellulaire. Le MTA est soit excrété après transformation en méthylthioribose (MTR), soit recyclé. Le cycle du MTA (aussi appelé cycle de Yang ou encore voie MSP pour « Methionine Salvage Pathway ») permet donc aux cellules d'éliminer ce MTA en le recyclant pour notamment régénérer de la L-méthionine. Lors de la partie sur l'étude des voies de recyclage de la méthionine, nous verrons également que le MTA peut aussi conduire à la synthèse de sulfites SO_3^{2-} ou de H_2S , via l'un des intermédiaires de ce cycle, le 4-(méthylsulfanyl)-2-oxobutanoate ou KMBA. Le cycle du MTA se retrouve chez tous les types d'organisme, que ce soit les bactéries, les plantes ou les animaux ; c'est pourquoi il est parfois qualifié d'universel, malgré l'existence de variantes²¹⁴. La figure 42 ci-dessous permet de résumer les voies que nous venons d'énumérer et de schématiser l'ensemble des voies que nous allons développer dans la suite de cette partie.

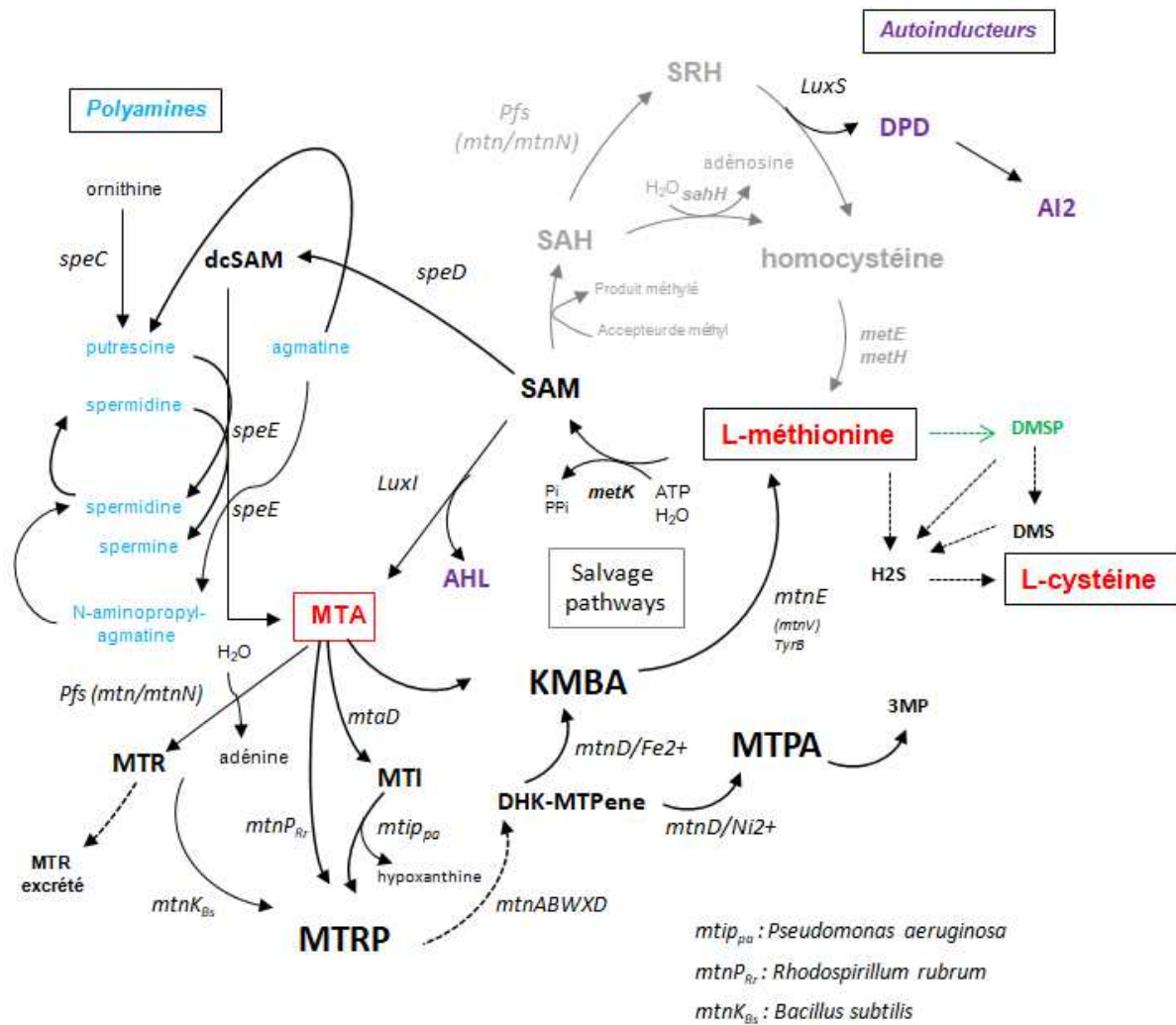


Figure 42 : Schéma des voies qui produisent le MTA à partir du cycle AdoMet et son recyclage. SAM : S-Adénosylméthionine ; SAH : S-Adénolsyl homocystéine ; SRH : S-ribosyl homocystéine ; AHL : N-acyl-homoserine lactones (quorum sensing) ; MTA : S-méthyl-5-adénosine ; MTR : S-méthyl-5-thioribose ; KMBA : 2-oxo acid 2-oxo 4-méthylthiobutyric acid ; MTI : S-méthyl-5'-thioinosine ; MTRP : S-(méthyl)-5-thio- α -D-ribose1P. Les flèches en pointillés indiquent des voies avec plus d'une réaction, et la couleur verte que cette voie n'est pas bactérienne ; DMSP : diméthylsulfoniopropanoate ; DHK-MTPene : 1,2-dihydroxy-3-ceto-5-(méthylthio)pent(1)ene ; MTPA : 3-méthylthiopropanoate ; 3MP : 3-sulfanylpropanoate.

Ainsi le MTA est recyclé via le cycle dit « universel » du MTA, mais celui-ci ne fonctionne, sous sa forme la plus décrite, qu'en aérobie et serait donc incapable de fonctionner sous conditions anoxiques chez les organismes possédant la voie classique. C'est pourquoi, la bactérie anaérobie facultative *B. subtilis* s'avère incapable de croître en anaérobie en utilisant les dérivés de MTA comme seules sources de soufre²¹⁶. Néanmoins, certaines bactéries comme *Rhodospirillum rubrum* et *Rhodopseudomonas palustris* ont développé une voie de recyclage du MTA en anaérobie via la formation d'éthylène, décrite par North et al. en 2017²¹⁵. En l'absence de cette voie, les organismes doivent éliminer le MTA au détriment du soufre et du carbone biologique qu'il contient. Par exemple, *E. coli* effectue l'hydrolyse enzymatique du MTA, entraînant le relargage dans la cellule de l'adénine,

puis excrète le 5-(méthylthio)ribose (MTR) formé, ce qui suggère l'absence de cycle fonctionnel au-delà de l'hydrolyse du MTA et du recyclage de l'adénine chez cette bactérie²¹⁷. Cette perte de soufre expliquerait d'ailleurs pourquoi la polyamine la plus retrouvée chez *E. coli* est la putrescine et pas la spermidine²¹⁸. En effet, *E. coli* peut produire directement de la putrescine à partir de l'ornithine, tandis que la production de spermidine nécessite la production de MTA ; or cette réaction aggraverait la perte de soufre, le MTA étant hydrolysé en MTR puis excrété. À noter malgré cela qu'aucun transporteur du MTR n'est actuellement connu.

Alors que la plus grande partie du cycle est conservée parmi les organismes, il existe néanmoins plusieurs variantes qui diffèrent dans les étapes initiales de la voie, entre le MTA et son dérivé 5-(méthylthio)ribulose 1-phosphate (MTRuP). Ces variantes, décrites chez les bactéries, les plantes, les eucaryotes supérieurs et les protozoaires, sont dues aux diverses voies de dégradation du MTA. Ces différences métaboliques dans les premières étapes du cycle du MTA sont par ailleurs exploitées pour le développement de nouveaux médicaments ciblés contre les micro-organismes pathogènes.

Plusieurs voies de dégradation du MTA ont été décrites. Toutes ces voies ont cependant en commun l'intermédiaire *S*-(méthyl)-5-thio- α -D-ribose 1-phosphate (MTRP), qui peut être produit de trois façons différentes selon les organismes (cf. figure 42 précédant) :

- Chez les eucaryotes supérieurs, le recyclage du MTA en méthionine commence par un clivage phosphorolytique via la MTA phosphorylase MtnP (EC 2.4.2.28) pour donner du MTRP. MtnP est notamment retrouvée chez l'homme et les eucaryotes supérieurs, mais a également été décrite chez la bactérie *Rhodospirillum rubrum* (Uniprot ID : Q2RXH9). Il s'est finalement avéré que bien d'autres bactéries possédaient ce gène (~30% des bactéries et quelques archées)²¹⁹.
- Contrairement aux eucaryotes, dans la plupart des bactéries et des plantes la conversion du MTA en MTRP est obtenue par l'action de deux enzymes : la MTA nucléosidase MtnN (EC 3.2.2.16 ; décrite chez *B. subtilis*²²⁰ et *K. pneumoniae*²²¹) et la *S*-méthyl-5-thioribose (MTR) kinase MtnK (EC 2.7.1.100), via l'intermédiaire *S*-méthyl-5-thio-D-ribose (MTR). Chez les bactéries, MtnN est comme nous l'avons vu précédemment une enzyme bifonctionnelle MTA/SAH nucléosidase, hydrolysant de façon irréversible la liaison glycosidique existant à la fois dans le MTA et la SAH, et permettant ainsi le relargage de l'adénine. On estime qu'environ 50 % de toutes les bactéries séquencées possèdent un homologue du gène *mtnN* codant pour une MTA/SAH nucléosidase (MtnN) qui catalyse l'hydrolyse du MTA en MTR et adénine²²².
- La dernière voie comporte deux étapes et a été décrite chez le parasite *Plasmodium falciparum*²²³ mais aussi chez l'archée *Methanocaldococcus jannaschii* et quelques bactéries telle que *P. aeruginosa*²²⁴. Le MTA est d'abord transformé en intermédiaire *S*-méthyl-5'-thioinosine (MTI) par une MTA déaminase (MtaD chez *Thermotoga maritima* (Uniprot ID : Q9X034) mais DadD chez *M. jannaschii* (Uniprot ID : Q58936)). Puis le MTI est converti en MTRP via une MTI phosphorylase, réaction entraînant le relargage d'hypoxanthine^{225,226}. Chez *P. aeruginosa*, l'enzyme identifiée spécifique du MTI (MTIP ; Uniprot ID : Q9HZK1) a été caractérisée par Guan et al.²²⁴

Une fois que le MTRP est formé, il est recyclé en L-méthionine en 6 étapes assez conservées, comprenant une isomérase MtnA (EC 5.3.1.23), une déshydratase MtnB (EC 4.2.1.109), une énalase MtnW (EC 5.3.2.5), une phosphatase MtnX (EC 3.1.3.87 ; à noter l'existence d'une enzyme bifonctionnelle énalase-phosphatase chez *Klebsiella oxytoca*, nommée MtnC - EC 3.1.3.77²²⁷), une

oxygénase MtnD (EC 1.13.11.54 ; à noter que cette réaction peut également se réaliser spontanément) et une transaminase MtnE (EC 2.6.1.-, KMBA transaminase).

MtnE, qui est donc une transaminase dépendante de la glutamine, conduit à partir du KMBA à la formation de L-méthionine et du sous-produit 2-oxoglutaramate, que l'on pense être toxique. Ainsi, une enzyme supplémentaire, une ω -amidase considérée comme faisant également partie de la voie, convertit ce dernier en 2-oxoglutarate²²⁸. Il a été montré que TyrB de la γ -protéobactérie *Klebsiella pneumoniae* (Uniprot ID : O85746), une transaminase d'acides aminés aromatiques impliquée dans la voie de biosynthèse de la tyrosine (figure 43), catalyse l'étape finale du recyclage de la méthionine (la conversion du KMBA en méthionine) chez des espèces de *Klebsiella*²²⁹. Les auteurs ont remarqué que plusieurs acides aminés différents peuvent fonctionner comme donneurs d'amine dans la formation de la méthionine. Les acides aminés aromatiques (Tyr, Trp, Phe) et le glutamate (Glu) se sont avérés être les donneurs d'amine les plus efficaces, tandis que l'histidine, la leucine, l'asparagine et l'arginine fonctionnent moins efficacement²²⁹. Une autre TyrB, issue de *Klebsiella oxytoca*, a également été identifiée²²⁷.

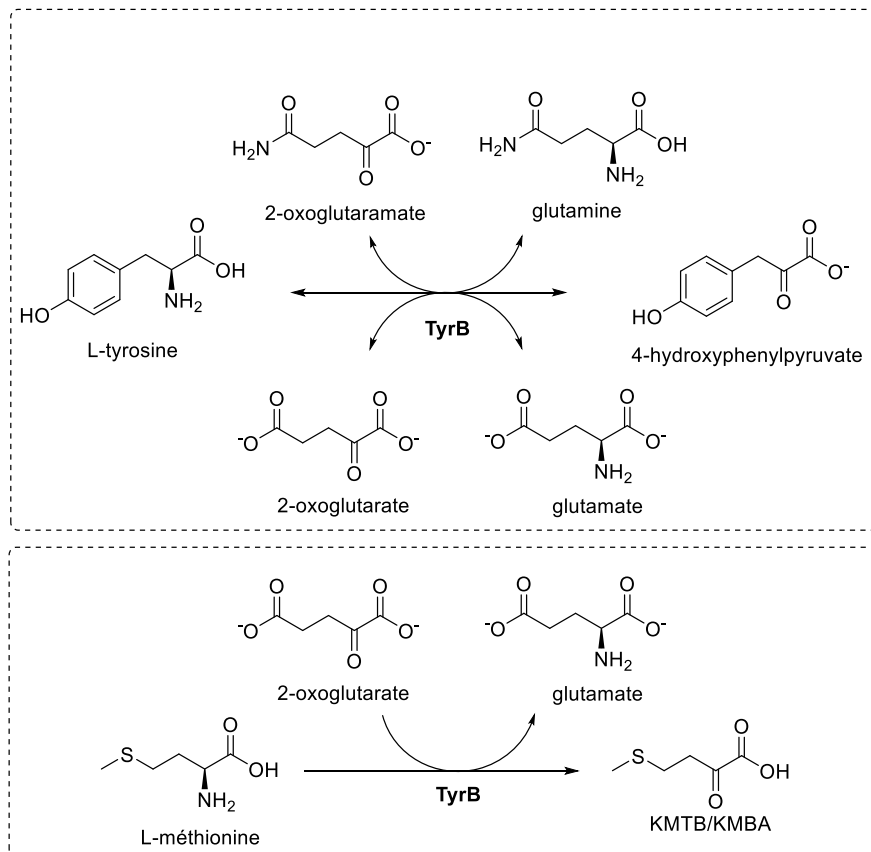


Figure 43 : Activités aminotransférases observées avec l'enzyme TyrB de *K. pneumoniae* sur L-tyrosine et L-méthionine.

Chez de nombreux parasites, comme *Plasmodium falciparum*, la conversion du KMBA en méthionine a été décrite comme étant catalysée par une aspartate transaminase (TAM). En 2003, Berger et ses collaborateurs ont montré que IlvE de *Bacillus subtilis* (Uniprot ID : O31461), appartenant à la même sous famille des transaminases que TyrB, catalyse également cette réaction²³⁰. Ils ont aussi montré qu'une deuxième sous-famille de transaminases catalyse cette réaction (transaminases de type IIIa et IIIb). Ils ont ainsi démontré que IlvK, qu'ils appellent BCAT2 (Uniprot ID : P39576), avait comme préférence d'acide aminé donneur la leucine, l'isoleucine, la valine, la phénylalanine et la tyrosine. Plusieurs autres IlvE TAM ont été caractérisées en dehors des firmicutes, montrant que cette activité est répandue²³¹.

À noter que chez *E. coli*, le gène *ybdL* a été identifié comme codant pour une potentielle méthionine aminotransférase, mais seule la première moitié de réaction a été expérimentalement mesurée, c.-à-d. le transfert d'un groupement amine d'un acide aminé vers le cofacteur enzymatique PLP. Le substrat préférentiel de YbdL (Uniprot ID : P77806) est la méthionine, suivie par l'histidine et la phénylalanine. Une structure cristalline de YbdL a été résolue, montrant un repliement typique d'aspartate aminotransférase. De plus YbdL contient un PLP covalent lié au résidu conservé Lys236 du site actif²³². Enfin, il a été observé qu'en conditions aérobies et dans un milieu défini, l'expression de *ybdL* est augmentée par l'exposition des bactéries à la S-nitrosoglutathione²³³. D'autres accepteurs d'amine peuvent être utilisés à la place du 2-oxoglutarate avec la L-méthionine, tels le 2-oxoglutaminate (EC 2.6.1), le céto-phénylpyruvate (EC 2.6.1.28) ou encore le glyoxylate (EC 2.6.1.73), ces trois réactions aboutissant également à la synthèse de KMBA et de glutamine, phénylalanine et glycine respectivement.

Les enzymes et les réactions de ces 6 étapes présentent quelques caractéristiques originales²¹⁹. Chez le firmicute *B. subtilis*, une voie complète de récupération de la méthionine existe aussi, et les gènes codant pour les enzymes impliquées dans le cycle du MTA sont co-localisés et organisés en opérons²¹⁶, ce qui n'est pas le cas chez *K. pneumoniae* (figure 44).

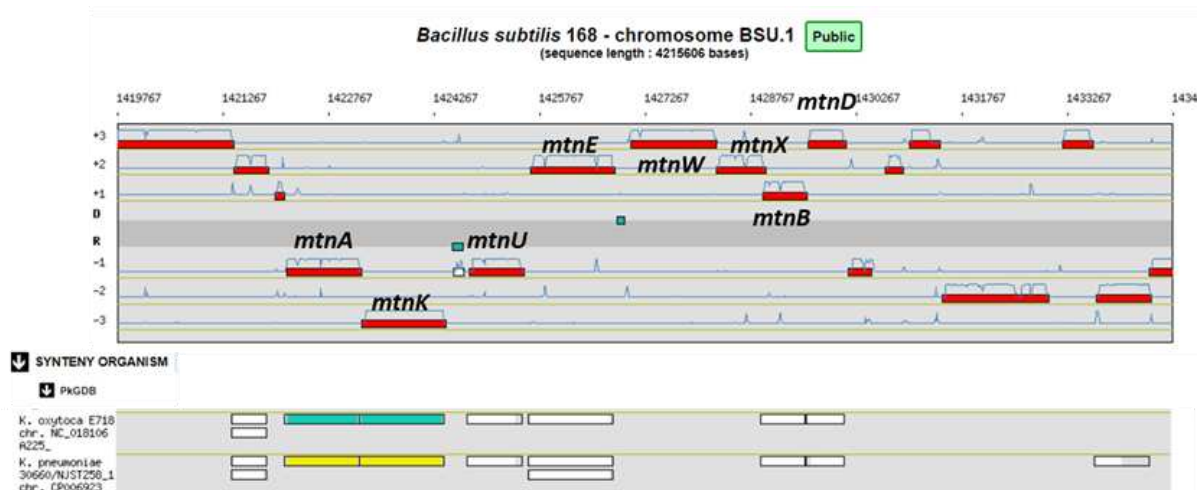


Figure 44 : Illustration de la synténie non conservée pour les gènes impliqués dans le cycle du MTA chez *B. subtilis* versus *K. pneumoniae*. Cluster de gènes numérotés de *mtnA* (BSU13550 ; Uniprot ID : O31662) à *mtnD* (BSU13620 ; Uniprot ID : O31669). Réalisée via la plateforme MicroScope/MaGe.

Cette voie de recyclage du MTA est chimiquement similaire à celle de *K. pneumoniae*, mais les enzymes recrutées à cette fin sont différentes (figure 45). Ainsi chez *B. subtilis*, l'étape usuellement catalysée par MtnC et permettant de passer du 2,3-dicéto-5-méthylthiopentyl-1-phosphate (DK-MTP-1P) au 1,2-dihydroxy-3-céto-5-(méthylthio)pent(1)ene (DHK-MTPene) est remplacée par deux réactions successives catalysées par les enzymes MtnW et MtnX (figure 45). D'abord, la DK-MTP-1P énolese MtnW_{subtilis} (Uniprot ID : O31666), homologue à la protéine RuBisCo (D-Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase)²³⁴, catalyse l'insertion d'une double liaison dans le DK-MTP-1P et ainsi la formation d'un énol-phosphate. Cela permet alors à MtnX_{subtilis} (Uniprot ID : O31667) d'hydrolyser plus facilement la fonction phosphate pour former le DHK-MTPene. Tandis que chez certains organismes, dont *K. oxytoca*, les réactions catalysées par MtnW et MtnX (une 2-hydroxy-3-céto-5-méthylthiopentenyl-1-phosphate phosphatase) sont catalysées par une seule enzyme, l'acireductone synthase MtnC telle que citée précédemment.

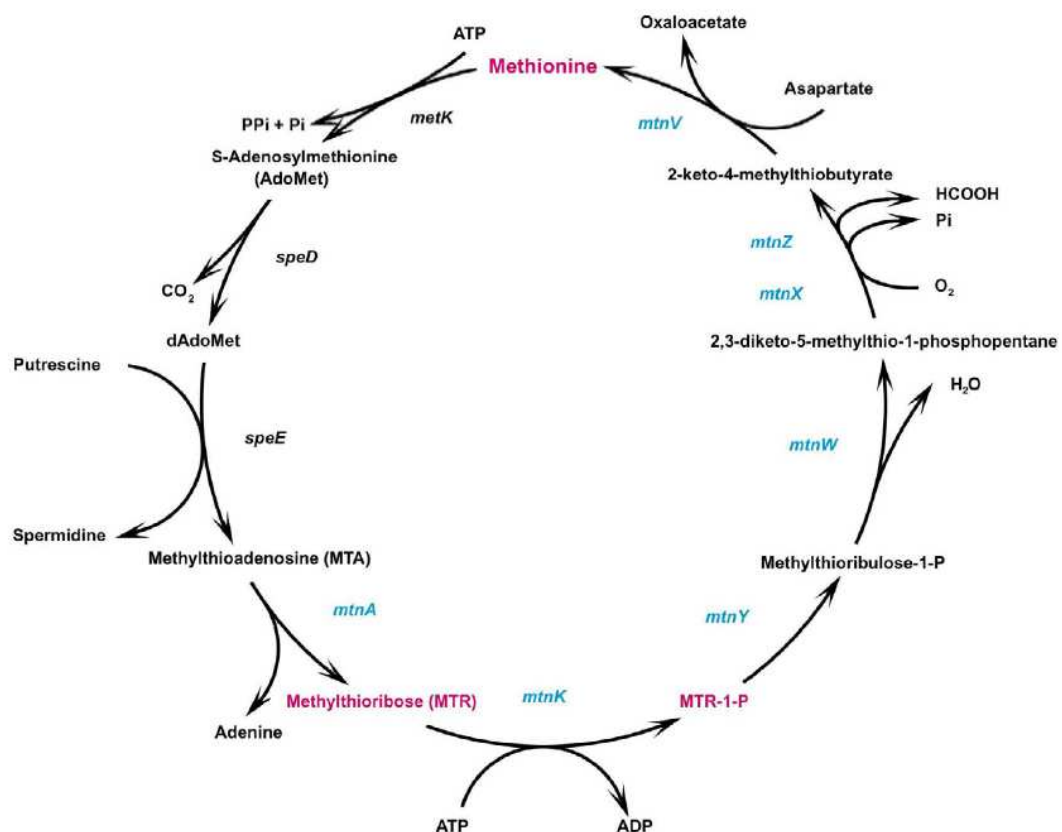


Figure 45 : Voie de recyclage du MTA chez *Bacillus subtilis* via le cluster de gènes *mtn*. 2-céto-4-méthylthiobutyrate = KMBA (issu de Sekowska & Danchin, 2002).

Une caractéristique déterminante du cycle du MTA est l'exigence d'oxygène moléculaire par la dioxygénase bifonctionnelle MtnD (MtnBD chez le protozoaire *Tetrahymena thermophila*²³⁵) pour générer le KMBA, précurseur de la méthionine, et du formate à partir du DHK-MTPene (figure 48). La réaction est catalysée par une enzyme remarquable, l'acireductone dioxygénase MtnD (MtnD_{subtilis}, Uniprot ID : O31669 ; ARD²³⁶ chez *Klebsiella pneumoniae*, article finalement rattaché dans Uniprot à l'entrée Uniprot ID : Q9ZFE7 de *Klebsiella oxytoca*), exigeant du fer II²³⁷. Cette dioxygénase très étudiée a la particularité de catalyser deux réactions différentes *in vivo* à partir du même substrat selon le métal présent dans son site actif (figure 46).



Figure 46 : L'acireductone dioxygénase MtnD, une enzyme et deux réactions suivant le métal utilisé (issu de Deshpande et al., 2017).

En effet, lorsque MtnD se lie au Ni^{2+} plutôt qu'au Fe^{2+} (EC 1.13.11.53), elle catalyse la formation de 3-méthylthiopropanoate (MTPA), appelé aussi méthylmercaptopropionate (MMPA), à partir du DHK-MTPene avec du CO_2 et du formate comme co-produits, court-circuitant le recyclage du MTA^{236,238}. Le rôle physiologique de ce détournement n'a pas été élucidé à notre connaissance bien que plusieurs hypothèses aient été avancées par les auteurs : (1) une fonction de défense grâce à la cytotoxicité du MTPA, déjà observée dans des processus de phytopathogénicité de certaines bactéries du sol ; (2) le CO formé pourrait servir de molécule signal ou (3) intervenir dans l'homéostasie de la méthionine.

À notre connaissance, le MTPA n'est pas métabolisé dans ces organismes. Cependant le MTPA (qui peut également être issu de la déméthylation du diméthylsulfoniopropionate (DMSP) peut à son tour être assimilé et transformé en sulfite par d'autres bactéries notamment marines ou sédimentaires²³⁹. Cette assimilation commence également par une déméthylation qui conduit au 3-sulfanylpropanoate (ou 3-mercaptopropionique acid, 3MP)²⁴⁰, composé soufré très abondant dans les sédiments marins. Cette voie d'assimilation du DMSP semble faire intervenir des processus de commensalité dans les écosystèmes sédimentaires car, à notre connaissance, il n'y a pas encore de bactérie identifiée ayant cette voie complète via le MTPA : des bactéries différentes effectuent des portions de voies de l'assimilation, fournissant aux autres les intermédiaires ou le soufre final²⁴¹. Maarel et al. ont ainsi montré chez l'archée méthanogène *Methanosarcina* sp. MTP4, que le MTPA était assimilé via la formation de 3MP et de méthane avec relargage de méthane, mais que c'est sans doute une autre bactérie qui réalise la déméthylation du DMSP²⁴². On retrouve le 3MP également comme intermédiaire du catabolisme de certaines molécules soufrées comme le 3,3'-dithiodipropionate (aussi appelé DTDP), un disulfure organique précurseur de synthèse des polythioesters (PTEs)²⁴³. Chez *Advenella mimigardefordensis* DPN7, une β -protéobactérie qui a été isolée en raison de sa capacité à utiliser le DTDP²⁴⁴, celui-ci est utilisé comme source d'énergie et de carbone, mais la bactérie excrète le sulfite produit (figure 47).

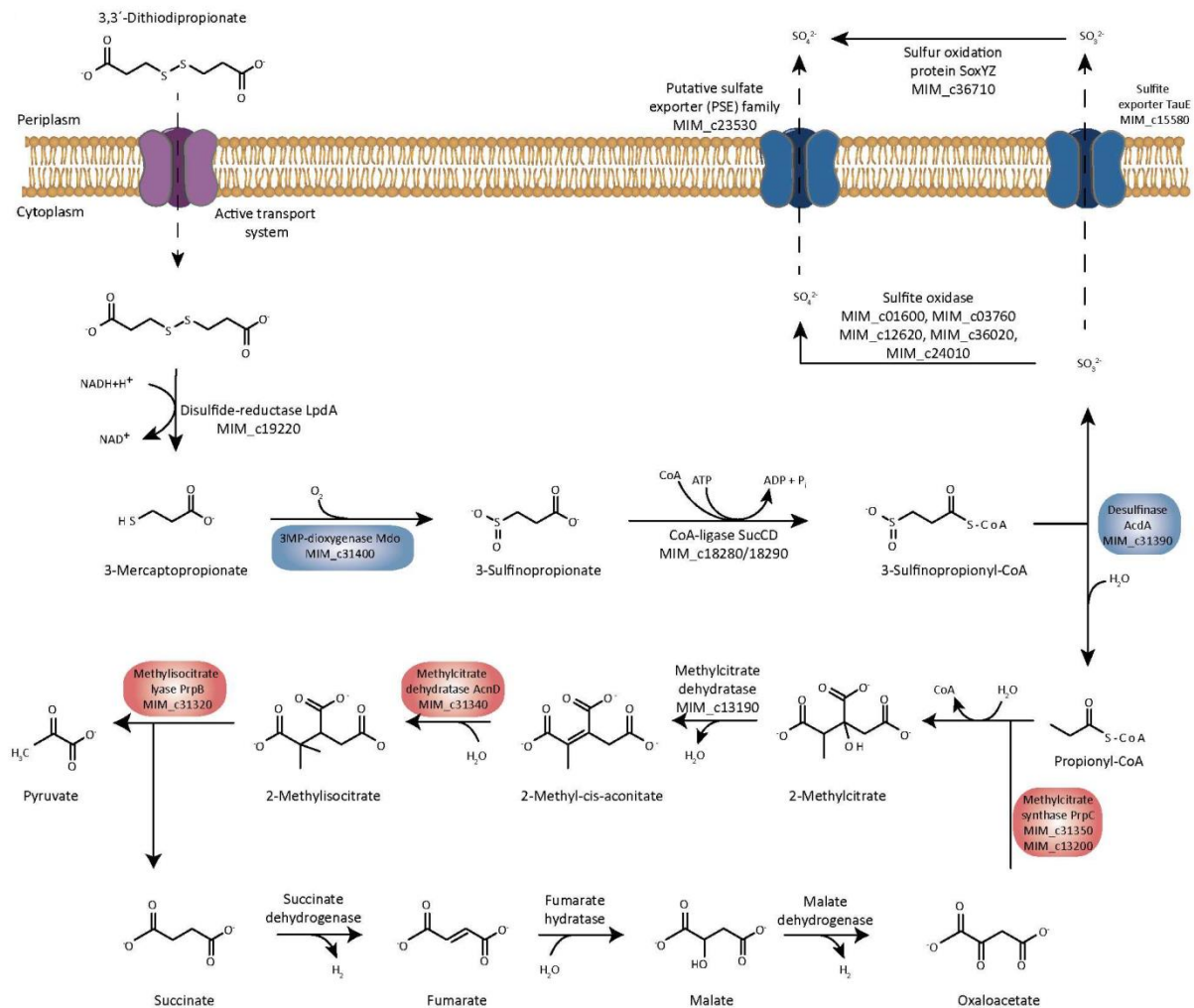


Figure 47 : Assimilation du DTDP chez *Advenella mimigardefordensis* DPN7 via la formation de 3MP (issu de Meinert et al., 2017).

Revenons au cycle de Yang. Comme nous l'avons précédemment vu, ce cycle implique des enzymes qui nécessitent de l'oxygène, et l'élimination du MTA dans des environnements anoxiques est restée longtemps relativement inconnue^{214,219}. La première voie de recyclage du MTA en méthionine ne nécessitant pas de dioxygène, appelée «shunt MTA isoprénoïde», a été entièrement caractérisée récemment chez la bactérie anaérobie facultative *Rhodospirillum rubrum*, où elle fonctionne à la fois en conditions aérobie¹²⁹ et anaérobie²⁴⁵. Cette variante bifurquée de la voie « classique » au niveau du MTRuP (figure 48).

Rlp1_{rubrum} (Uniprot ID : Q2RSU7), protéine RubisCO-like (RLP) du clade IV-DeepYkr^{246,247} (ce clade comprend les RubisCO et RLP présentes chez les α -protéobactéries et les clostridia pour les procaryotes), isomérisé le MTRu1P en un mélange de MTRu5P et de 1-(méthylthio)xylulose-5-phosphate (MTXu5P). Le MTXu5P est ensuite pris en charge par une MTXuP méthylsulfurylase (Uniprot ID : Q2RSU5) à motif cupine^{248,249}, catalysant le transfert du groupement thiométhyle sur le glutathion : cela conduit à la formation de S-(méthylthio)glutathion et de 1-désoxyxylulose-5-P (DXP), utilisé pour la biosynthèse d'isoprénoïdes. La réduction de l'adduit S-(méthylthio)glutathion permet par la suite la régénération du glutathion via le cycle du γ -glutamyle, ainsi que la libération de méthanthiol ; le

méthanethiol est enfin conjugué à l'*O*-acétyl-L-homosérine (OAH) via une OAH sulfhydrylase, régénérant alors la L-méthionine¹²⁹.

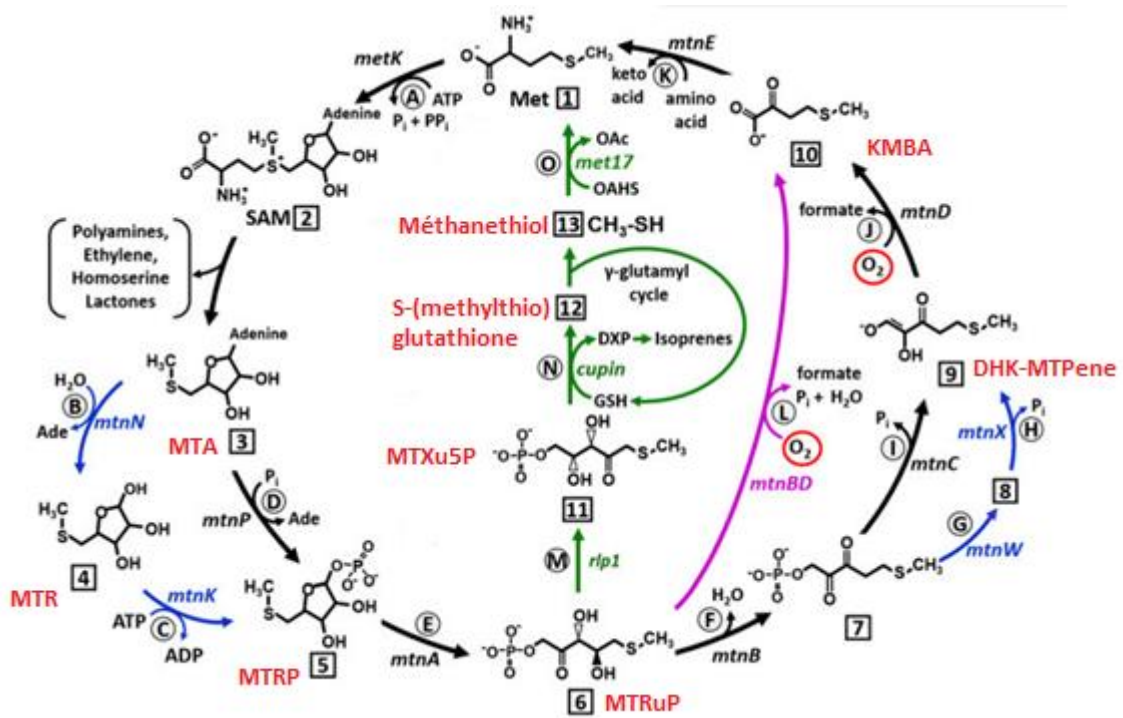


Figure 48 : « MTA-isoprenoid shunt » caractérisé chez la bactérie anaérobie facultative et phototrophique *Rhodospirillum rubrum*. Le shunt est indiqué par des flèches vertes. En violet, l'enzyme de fusion du protozoaire *Tetrahymena* catalysant les étapes déshydratase, émolase et dioxygénase. En bleu, les variantes bactériennes : chez *Bacillus subtilis*, la MTA phosphorylase (mtnP) est remplacée par les deux enzymes MTA nucléosidase (mtnN) et MTR kinase (mtnK) ; l'émolase-phosphatase bifonctionnelle (mtnC) est remplacée par une émolase DK-MTP-1P (mtnW), du clade RLP Ykr, et une phosphatase HK-MTPene-1P (mtnX). **MTRP** : *S*-(méthyl)-5-thio- α -D-ribose1P ; **MTRuP** : 5-(méthylthio)ribulose 1-phosphate ; **MTXu5P** : 1-(méthylthio)xylulose-5-phosphate (modifié de North et al., 2017).

D'autres variations de cette voie peuvent exister, notamment car certaines bactéries contiennent tous les gènes nécessaires à ce shunt MTA-isoprénoïde dans un seul cluster, mais où le gène *cupine* est remplacé par une transcétolase, enzyme candidate pour la libération de méthanethiol à partir de MTXu5P²⁵⁰. De plus, alors que la découverte du shunt MTA-isoprénoïde a permis de clairement établir l'existence d'un cycle MTA-anaérobie chez les bactéries, celui-ci ne semble pas indispensable à la croissance en condition anaérobie chez *R. rubrum*. En effet, les mutants $\Delta mtnA$, $\Delta rlp1$, ou $\Delta cupin$ (ces deux derniers gènes étant intrinsèques au shunt MTA-isoprénoïde) sont restés viables en croissance anaérobie sur MTA, tandis que les mutants de délétion $\Delta mtnP$, $\Delta mtnA$, $\Delta rlp1$ ou encore $\Delta cupin$ de cette bactérie ne peuvent croître sur MTA comme seule source de soufre en condition aérobie^{251,252}. Cela suggère ainsi la présence d'une autre voie anaérobie.

North et al. ont apporté une réponse en décrivant, chez *R. rubrum* notamment, une autre variante du cycle du MTA exclusivement anaérobie et couplant le métabolisme du MTA à la production d'éthylène (figure 49).

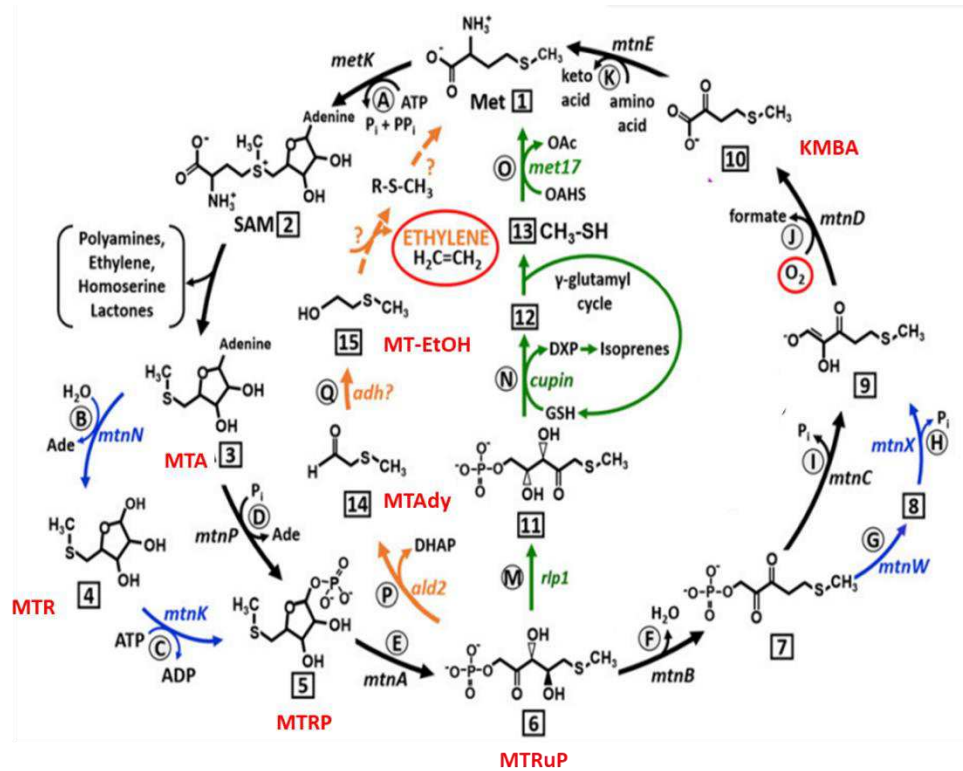


Figure 49 : « Voie de formation de l'éthylène » caractérisée chez la bactérie anaérobie facultative et phototrophique *Rhodospirillum rubrum*. MTRP : S-(méthyl)-5-thio- α -D-ribose1P ; MTRuP : 5-(méthylthio)ribulose 1-phosphate ; MTAdy : 2-(méthylthio)acétaldéhyde ; MT-EtOH : 2-(méthylthio)éthanol (adapté et simplifié à partir de North et al., 2017)

Comme dans la voie du shunt isoprénolide, le cycle bifurque au niveau du MTRuP1P, via l'action d'une MTRuP1P aldolase (Ald2; Uniprot ID : Q2RXI1) et la formation de 2-(méthylthio)acétaldéhyde (MTAdy) ainsi que de dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en sous-produit. La détection *in vivo* de MTAdy n'a pas pu être établie mais la présence de 2-(méthylthio)éthanol (MT-EtOH) a été observée ; de plus les auteurs ont pu former du MT-EtOH à partir de MTAdy en présence d'une alcool déshydrogénase commerciale de *Saccharomyces cerevisiae*, suggérant une voie similaire chez les organismes étudiés. Les gènes codant pour les enzymes permettant de faire le lien entre le MT-EtOH et la méthionine n'ont pu être identifiés. Les résultats expérimentaux suggèrent néanmoins que la biosynthèse de la méthionine à partir du MT-EtOH passe par la formation d'éthylène, du fait notamment que la quantité d'éthylène produite s'est avérée spécifiquement et stoechiométriquement proportionnelle à la quantité de MTAdy ou MT-EtOH utilisée pour la croissance des bactéries. En outre, la production de méthane n'ayant été observée que lorsque la voie du shunt MTA-isoprénolide est fonctionnelle, les auteurs proposent la présence d'un intermédiaire R-S-CH₃ non déterminé mais nécessaire pour la production potentielle, *in fine*, de L-méthionine. Il est par ailleurs intéressant de noter que *R. rubrum* et *R. rubrum* n'ont pas pu croître sur MT-EtOH comme unique source de soufre

en condition aérobie. Ceci est en accord avec le fait que le mutant *Δrlp1* ne pousse pas en aérobie et confirme que cette voie est exclusive à la condition anaérobie, bien que les données récoltées sur l'activité d'Ald2 montrent que cette enzyme serait active *in vitro* en aérobie¹²⁹. Enfin, l'étude via la comparaison de génomes sur KEGG de la distribution des gènes *mtnP* (ou *mtnK*), *mtnA*, importants pour le cycle du MTA dit « universel », et *ald2*, impliqué dans le métabolisme du fuculose, a montré que ~7 % des génomes bactériens possèdent ces gènes ou leurs homologues. De plus, l'expression hétérologue chez le double mutant *R. rubrum Δrlp1/Δald2* du gène *ald2*, provenant soit de la γ -protéobactérie *Morganella morganii* aérobie/anaérobie, soit du clostridium anaérobie stricte *Eubacterium limosum*, a permis de rétablir la production d'éthylène chez ces organismes lors de tests de croissance sur MTA. Les auteurs en ont conclu que le gène putatif *ald2* de ces organismes y joue un rôle similaire à celui joué chez *R. rubrum*²¹⁵. Ces gènes semblent donc être largement distribués parmi les bactéries par opposition à ceux du shunt MTA-isoprénoïde, et cette voie révèle un possible moyen par lequel l'éthylène, fréquemment observé dans les environnements anoxiques, peut être produit par les microbes qui leurs sont indigènes. Enfin très récemment, une nouvelle étude de la bactérie *Rhodopseudomonas palustris*, également anaérobie facultative, a montré la co-existence en aérobie à la fois du shunt MTA-isoprénoïde décrit chez *R. rubrum*, et d'un shunt DHAP-méthanethiol, semblable à celui du shunt DHAP-éthylène mais où le MT-EtOH est ici converti en méthanethiol, celui-ci pouvant probablement être à son tour utilisé par l'une des deux OAHs pour régénérer de la méthionine en présence d'OAH²⁵³.

En dehors des voies anaérobies strictes du cycle du MTA, le KMBA constitue le pénultième produit commun à l'ensemble des variants de ce cycle, et, un métabolite incontournable pour la régénération de la méthionine. Cependant, le KMBA peut également être utilisé pour la synthèse directe ou indirecte d'autres biomolécules comme le méthionol, le méthanethiol ou encore le diméthylsulfoniopropionate (DMSP), ces deux dernières pouvant servir de réservoir de soufre pour la synthèse *de novo* de cystéine. Pour plus de clarté dans ce manuscrit, nous aborderons ces voies de biosynthèse dans la partie suivante, en considérant le KMBA comme intermédiaire de la voie de recyclage de la L-méthionine en L-cystéine, mais il va de soit que ces voies peuvent exister directement à partir du KMBA issu du cycle de Yang sans passer par la synthèse de L-méthionine.

1.3.2 Voies de recyclage de la L-méthionine et de la L-cystéine

Nous allons aborder ici la question du recyclage au sens large de la méthionine et de la cystéine, c.-à-d. le renvoi d'un produit issu d'une ou plusieurs transformations enzymatiques en un point situé en amont de la biosynthèse de ce produit. Comme nous l'avons vu, les deux molécules principales sources de soufre pour la formation de méthionine directement incorporées à l'*O*-acyl-homosérine sont le soufre inorganique contenu dans H₂S, et, la L-cystéine ; l'objectif est donc ici d'avoir une vue d'ensemble des différentes voies permettant de rejoindre ces deux molécules considérées comme clefs, en amont de la biosynthèse de la L-méthionine.

1.3.2.1 Catabolisme de la L-cystéine en H₂S

Il existe plusieurs types d'enzymes capables de dégrader la cystéine en H₂S chez les bactéries. Ce sont surtout des enzymes à PLP comme la L-cystéine désulfurase (EC 2.8.1.7) de la famille SufS, et les D/L-cystéine désulfhydrases (CD, EC 4.4.1.1.15), assez promiscuitaires. L'activité CD est par ailleurs souvent catalysée par des enzymes paralogues diversement impliquées dans le métabolisme du soufre comme évoqué précédemment. Chez *E. coli* par exemple, plusieurs enzymes ont une activité CD : la CBL, les cystéine synthases A (CysK_{coli} ; Uniprot ID : P0ABK5) et B (CysM_{coli} ; Uniprot ID : P16703)¹¹⁴, la triptophanase (TnaA_{coli} ; Uniprot ID : P0A853) impliquée dans le métabolisme de l'indole et MalY_{coli} (Uniprot ID : P23256) impliquée dans le métabolisme du maltose. Chez *B. subtilis* on trouve une CBL secondaire, PatB (Uniprot ID : Q08432) qui a 33 % d'identité avec MalY_{coli}¹¹⁵, ainsi qu'une CGL (MccB_{subtilis}/YrhB, Uniprot ID : O05394) : toutes les deux présentent une activité CD.

Récemment, un nouveau type de dégradation de la L-cystéine a été décrit chez l'archée *Methanocaldococcus jannaschii*²⁵⁴. Cette voie implique une L-cystéine désulfidase (Uniprot ID : Q58431) à cluster [4Fe-4S] très spécifique de la L-cystéine et qui n'utilise pas de PLP. Comme les CD à PLP, elle catalyse le clivage de la L-cystéine pour former de l'H₂S et du 2-aminoprop-2-énoate, qui s'hydrolyse ensuite spontanément en pyruvate et NH₃ (figure 50).

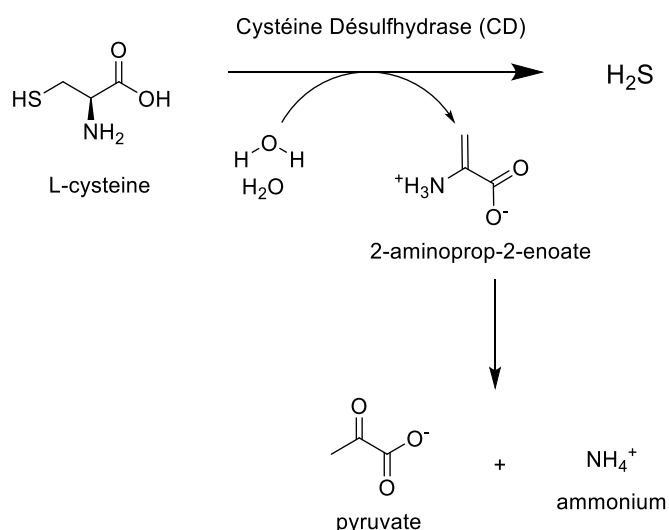


Figure 50 : Production de sulfure d'hydrogène (H₂S) à partir de L-cystéine via l'activité L-cystéine désulfhydrase.

La L-cystéine désulfhydrase est sensible à l'oxygène et semble assez répandue chez les bactéries anaérobies. Chez certains pathogènes, il a été montré que les L-cystéine désulfhydrases CdsB, sont des enzymes impliquées dans la virulence comme chez *Yersinia ruckeri*²⁵⁵ et *Clostridium difficile*. Chez *C. difficile*, il a même été montré récemment par Gu et al. que CdsB est en plus induite par la L-cystéine et que cette enzyme serait impliquée dans la régulation de la production de toxines²⁵⁶. De même, la L-cystéine désulfhydrase Cdl (Uniprot ID : Q8L0X3) de la bactérie anaérobie *Fusobacterium nucleatum*, spécifique de la L-cystéine, pourrait également selon les auteurs intervenir dans sa pathogénicité via la production de H₂S²⁵⁷.

Une autre route, longtemps pensée comme spécifique aux eucaryotes, passe par la cystéine sulfinat (3-sulfinoalanine) grâce à une cystéine dioxygénase (CDO, EC 1.13.11.20) pour former *in fine* de l'H₂S et de l'hypotaurine/taurine (figure 51).

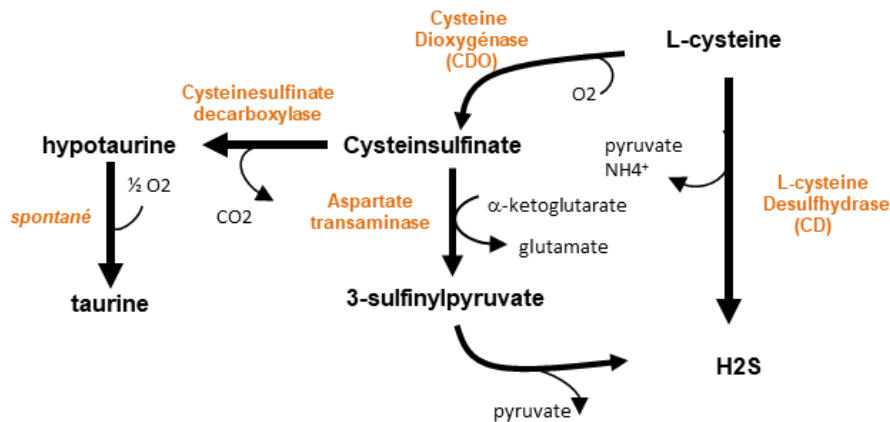


Figure 51 : Catabolisme de la cystéine chez les eucaryotes via la cystéine dioxygénase CDO.

En 2006, sur la base d'une analyse structurale des CDO de mammifères appartenant à la large classe des enzymes à motif cupine, des CDO procaryotes ont pu être identifiées et caractérisées notamment chez *B. subtilis* (CdoA, Uniprot ID : O32085)²⁵⁸. L'activité CDO a pu être mesurée sur lysat cellulaire de *B. subtilis* alors qu'elle disparaît dans celui d'un mutant $\Delta cdoA$ ($\Delta yubC$). L'activité CDO a également été décrite plus récemment chez *P. aeruginosa*, via l'activité marginale d'une 3-mercaptopropionate dioxygénase (Uniprot ID : Q9I0N5)²⁵⁹. La présence répandue chez les procaryotes d'aspartate transaminases laisse penser à Dominy et al. que du 3-sulfinylpyruvate se forme chez ces organismes. En revanche, le devenir du 3-sulfinylpyruvate chez ces procaryotes n'a pas été démontré bien que plusieurs hypothèses aient été avancées²⁵⁸. À notre connaissance la voie qui passe par l'hypotaurine n'a pas été identifiée complètement chez un procaryote, bien que des cystéine-sulfinate/sulfinoalanine décarboxylases (CSAD, EC : 4.1.1.29) aient été caractérisées en 2014 chez *Synechococcus sp.* PCC 7335 et *Polaribacter irgensii* par Agnello et al.²⁶⁰ Ils ont d'ailleurs noté que la co-localisation dans certains génomes procaryotes de CDO et de CSAD laisse imaginer que cette voie doit exister. Cependant, les auteurs ne donnent aucun identifiant des gènes caractérisés, comme cela est très souvent le cas malheureusement. Nous avons tout de même pu identifier la décarboxylase décrite par Agnello et al. (S7335_1983, Uniprot ID : B4WPS1) en recherchant, parmi les 15 décarboxylases prédites dans Uniprot pour le génome de *Synechococcus sp.*, celle qui contient le motif conservé des CSAD ([F/W/Y)aa₁₉SaY]). En 2018, Deng et ses collaborateurs ont caractérisé et amélioré par ingénierie protéique une CSAD provenant d'un métagénome (*undec1A* ; Uniprot ID : A0A2I9) dans l'objectif d'optimiser la synthèse de taurine à des fins biotechnologiques²⁶¹. Cette dernière décarboxylase n'a aucune identité de séquence avec celle de *B. subtilis* bien qu'elle partage la signature des CSAD.

1.3.2.2 Voie de transsulfuration réverse et cystéine

La voie de transsulfuration réverse est une voie de recyclage de la L-méthionine par exemple chez *B. subtilis*¹⁰⁹ ou *Klebsiella pneumoniae*¹⁴³, mais peut également être la voie de biosynthèse de la L-cystéine, comme décrite chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cette voie nécessite la régénération de l'homocystéine à partir de L-méthionine via le cycle AdoMet décrit précédemment, afin de former ensuite de la cystathionine puis la L-cystéine (figure 52). La biosynthèse de la cystathionine à partir de l'homocystéine est rendue possible grâce à une transférase, la cystathionine β -synthase (CBS). Cette enzyme à PLP catalyse le transfert sur la fonction thiol de l'homocystéine d'un groupement amino-acide via la β -substitution de la L-sérine (EC 4.2.1.22), réaction réalisée par MtcB comme chez *K. pneumoniae* (CBS appelée Cys4 chez *S. cerevisiae* ou CBS chez les mammifères), ou bien de l'O-acétyl-L-sérine (EC 4.1.1.134) via MccA comme chez *B. subtilis*. MtcB et MccA ont moins de 30% d'identité.

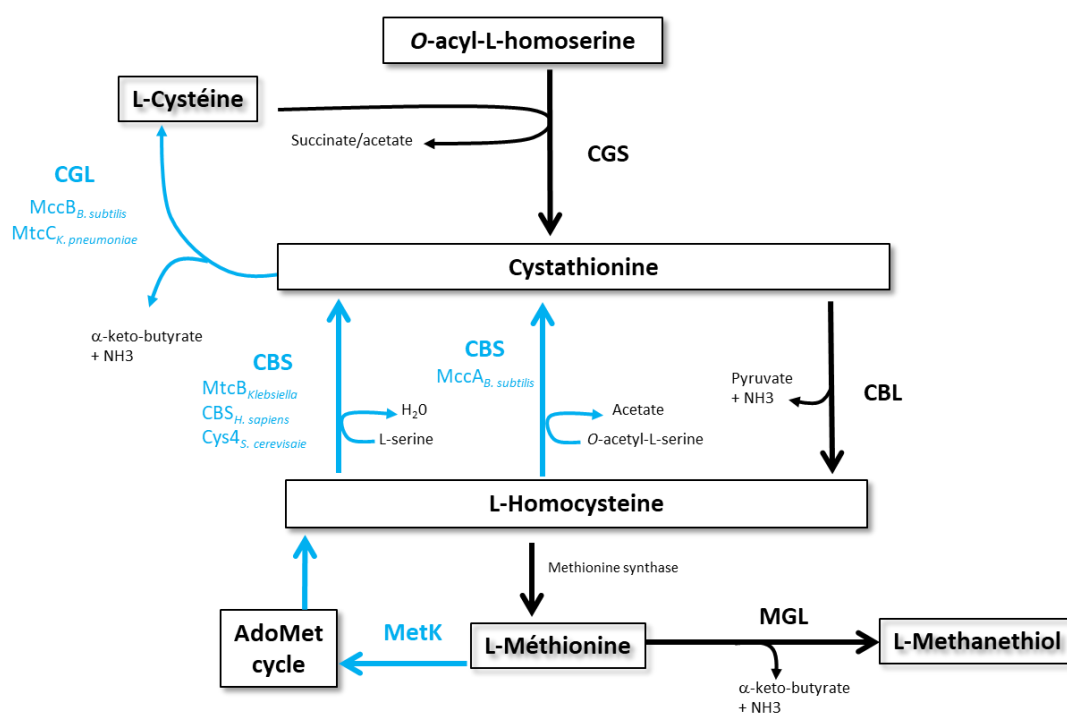


Figure 52 : Résumé des voies de transsulfuration reliant la biosynthèse de la L-méthionine et celle de la L-cystéine. La voie de transsulfuration réverse est indiquée en bleu. Chez *B. subtilis* MccA (Uniprot ID : O05393) et MccB (Uniprot ID : O05394) ; chez *Klebsiella pneumoniae* MtcB (Uniprot ID : Q0ZBA6) et MtcC (Uniprot ID : Q0ZBA7) ; chez *S. cerevisiae* Cys4 (Uniprot ID : P32582)

La liaison C γ -S de la cystathionine formée est ensuite clivée par une autre enzyme à PLP, la cystathionine γ -lyase (CGL, EC 4.4.1.1), et donne lieu à de la L-cystéine et à un co-produit énamine instable. La tautomérisation de cette énamine conduit à sa forme imine, qui subit elle-même une déamination hydrolytique résultant en la formation de 2-oxobutanoate et d'ammoniac. Bien que cette dernière réaction soit spontanée, elle peut aussi être accélérée enzymatiquement avec une 2-iminobutanoate/2-iminopropanoate (énamine/imine) déaminase (EC 3.5.99.10), réduisant ainsi la

durée de vie de ces intermédiaires très réactifs. Ces enzymes, qui appartiennent à la famille YjgF et se retrouvent dans tous les domaines du vivant, semblent dédiées à accélérer la libération d'ammoniac à partir des intermédiaires énamine/imine générés par la déshydratase PLP-dépendante, et ce dans différentes voies²⁶² (figure 53).

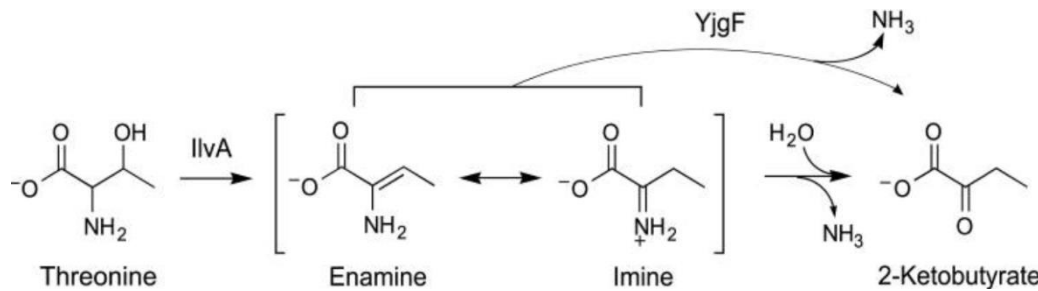


Figure 53 : Formation de l'intermédiaire énamine/imine après action sur la thréonine de l'enzyme déshydratase IlvA (issu de Lambrecht et al., 2012).

La CGL de *B. subtilis* s'appelle MccB alors que celle de *K. pneumoniae* MtcC, mais elles partagent 50% d'identité. Comme nous venons de le voir, selon les organismes, les deux enzymes de cette voie CBS et CBL portent des noms différents, ce qui rend encore plus complexe l'inventaire de ces enzymes souvent multifonctionnelles de ces voies. Chez *B. subtilis* comme chez *K. pneumoniae*, les gènes codant pour ces deux enzymes sont co-localisés (figure 54). Chez *B. subtilis* ils se trouvent en plus avec MtnN (MTA/SAH nucléosidase), qui permet à partir du cycle du MTA la synthèse de la L-homocystéine, substrat de la CBS.

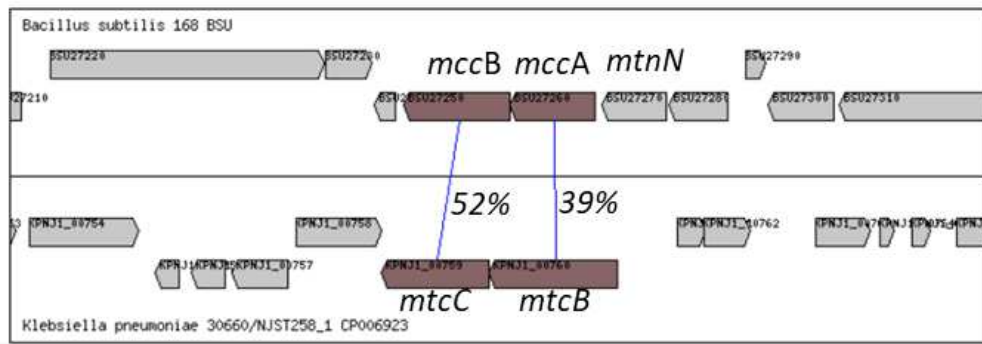


Figure 54 : Image de synténie des gènes codant pour les enzymes CBS et CGL chez *B. subtilis* et *K. pneumoniae*. Obtenue via la plateforme d'annotation MicroScope/MaGe (<http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/mage>).

La voie de transsulfuration, tout comme la voie de recyclage de la L-méthionine via le méthanethiol que nous allons aborder par la suite, ont été particulièrement étudiées chez les bactéries lactiques, largement utilisées dans l'industrie laitière depuis plus de mille ans. Les bactéries lactiques jouent un rôle essentiel dans la formation d'arômes lors de la fermentation des produits laitiers, et les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés soufrés sont connues pour être à l'origine de nombreux composés aromatisants dans ces fermentations, ainsi que de nombreux composés volatiles soufrés (CVS). La production de ces CVS résulte souvent de l'activité d'enzymes impliquées

dans la voie de transsulfuration réverse (CBS/CGL) mais aussi des désulfhydrases, de la méthionine γ -lyase (MGL) ou encore de cystéine/homocystéine désulfhydrases (CD/HD)²⁶³. Cependant, ces CVS produits par les bactéries lactiques sont aussi souvent traqués dans les process car ils sont parfois défavorables en termes d'arôme du vin ou des fromages, comme c'est le cas du méthane-thiol. Ces bactéries sont en effet également utilisées dans l'ensemencement des vins (méthode utilisée dans 7 à 8% des productions de vin à l'échelle mondiale selon l'institut français de la vigne et du vin, l'IFV). Cette technique semble présenter de nombreux avantages, dont la préservation des qualités organoleptiques des vins.

Il faut, encore une fois, être vigilant quant à l'inférence de fonctions dans ces voies par simple comparaison de séquence, comme l'illustre cette étude de 2008 sur *Lactobacillus casei* chez qui ces enzymes ont montré une promiscuité de substrats selon le pH. En effet, Irmiler et al. ont identifié deux cystathionine lyases, qu'ils ont nommées dans un premier temps comme CBL, MalY (LSEI_0894, Uniprot ID : Q03AS8) et MetC (LSEI_0600, Uniprot ID : Q03BH8) par homologies de séquence²⁶⁴. L'étude des produits de dégradation de MalY sur cystathionine a révélé qu'il s'agissait finalement d'une CBL et non d'une CGL, avec également une légère activité cystéine désulfhydrase (CD). Concernant MetC, plusieurs réactions ont été testées (figure 55).

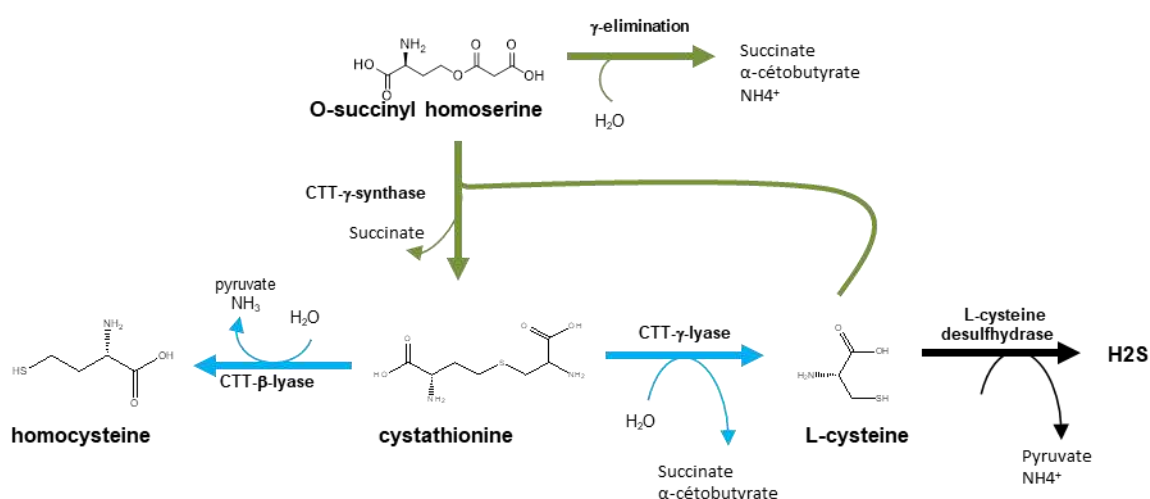


Figure 55 : Activités de γ -élimination (vert) et β/γ -lyase (bleu) testées dans l'étude de MetC de *Lactobacillus casei* par Irmiler et al. (2009).

Ils ont observé une libération de succinate et d' α -cétobutyrate en présence de cystathionine (pH 9) attestant d'une activité CGL, et de pyruvate en présence de cystéine (pH 6,8) attestant d'une activité CD. Lorsqu'ils ont testé à pH 6,8 la réaction de γ -élimination catalysée par cette enzyme sur OSH seul, précurseur dans la biosynthèse de cystathionine, ils ont observé le relargage de succinate et d' α -cétobutyrate comme observé avec la CGS_{coli}¹⁵⁴, tandis qu'en la testant en présence d'OSH et de L-cystéine ils n'ont pas détecté d'activité CGS. Puisque MetC a principalement montré une activité CGL à pH élevé (non physiologique), les auteurs ont proposé que cette enzyme fonctionne principalement comme une CGS dans la cellule et ont suggéré de désigner ce gène par *metB* au lieu de *metC*. Ils ont par ailleurs noté qu'il n'est peut-être pas inhabituel pour une CGS de montrer une activité lyase, donnant l'exemple de la CGS de *Salmonella* qui dégrade également la cystathionine à pH élevé²⁶⁵. Ces résultats obtenus *in vitro* ne reflètent cependant pas les activités obtenues *in vivo* sur extraits cellulaires de plusieurs souches de *L. casei* ; en effet les auteurs ont détecté à pH 5,5 une activité CGL

élevée sur cystathionine, liée à une libération de pyruvate et d' α -cétobutyrate. Le fait que cette activité soit la plus élevée à un pH bas indique qu'elle n'est pas codée par *metC*, et ne résulte pas non plus de MalY dont l'activité ne peut pas expliquer la formation d' α -cétobutyrate. Les auteurs en ont alors conclu qu'un troisième gène codant pour une CGL existe chez certaines souches de *L. casei*. Les auteurs ont aussi identifié chez *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* deux gènes identiques à 91%, *ctl1* (Uniprot ID : B3TNN8) et *ctl2* (Uniprot ID : B3TNN9) codant pour de possibles CBL/CGL. Les deux enzymes purifiées ont révélé une importante activité CGL à pH 5,5 tandis que seule Ctl1 était encore active à pH 6,8¹¹⁶. Bien qu'une activité lyase plus ou moins importante ait également été détectée sur méthionine, cystéine et homocystéine, celle-ci s'est avérée nulle à pH 6,8 et 9, montrant que l'activité de ces enzymes semble influencée par des conditions de pH particulières, les lactobacillus étant plutôt des bactéries acidophiles. Chez *L. fermentum*, une CGL a aussi été isolée et étudiée, avec cette fois une activité optimale à pH 8. Les auteurs ont pu observer que l'activité lyase la plus élevée était trouvée sur L-cystine et lanthionine, puis que cette activité évoluait de façon décroissante selon les substrats suivants : L-cystathionine (100%, avec relargage d' α -cétobutyrate) > L-cystéine (54%) > acide L-djenkolique > L-homocystéine > L-méthionine (14%) > L-homosérine²⁶⁶.

Liu et al. ont tenté d'améliorer l'annotation fonctionnelle des enzymes clefs dans la formation de composés aromatisants issus d'acides aminés en appliquant des approches de génomique comparative développées pour spécifier l'annotation des protéines homologues, en combinant la phylogénie, le contexte génétique et les preuves expérimentales²⁶³. L'analyse comparative par alignements de séquences de diverses espèces et souches de bactéries lactiques leur donne ainsi une vue d'ensemble des différences dans leurs capacités de formation d'arômes. En observant plus largement l'ensemble des bactéries lactiques, Liu et al. ont noté que les gènes codant pour les cystathionine lyases tombent en deux familles distinctes, CBL/CGL d'une part, et CBL d'autre part (figure 56). Les enzymes de ce dernier groupe partagent une similarité de séquence non négligeable avec les CBL/CGL (par exemple, le produit du gène *cgl* d'*Oenococcus oeni* a 67% d'identité avec les enzymes Ctl1 et Ctl2 de *L. casei*)¹¹⁷, mais ne présenteraient qu'une activité CBL. Concernant le groupe "CBL/CGL", Knoll et al. proposent que toutes les enzymes en faisant partie peuvent présenter un mélange d'activités CBL et CGL, impliquant néanmoins que certaines enzymes aient uniquement une activité CGL²⁶⁷. Les auteurs ont par ailleurs montré que l'enzyme Cgl d'*O. oeni* (OEOE_1758, Uniprot ID : Q04D73) possède une double activité CBL/CGL (formation, à partir de cystathionine, de pyruvate et d' α -cétobutyrate, ainsi que de sulfure d'hydrogène ; activité désulfhydrase confirmée sur L-cystéine et homocystéine). Comme pour l'enzyme MetC renommée MetB de *L. casei*, Cgl forme également de l' α -cétobutyrate et du succinate en présence d'OSH, et la combinaison de l'OSH à la cystéine a entraîné la libération supplémentaire de pyruvate mais surtout une réduction significative de l' α -cétobutyrate libéré, témoin d'une activité CGS. Cela laisse entendre, comme pour l'enzyme MetB de *L. casei*, que Cgl serait multifonctionnelle, son rôle physiologique exact restant à définir.

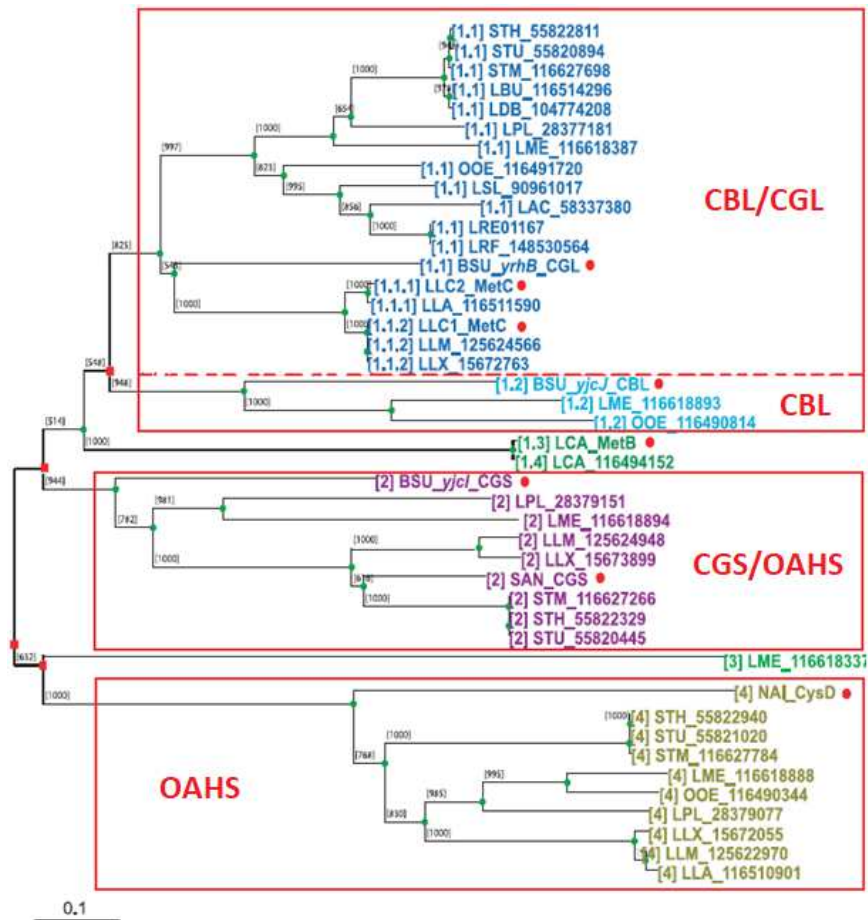


Figure 56 : Arbre taxonomique de la famille CBL/CGL lyase chez les bactéries lactiques. Les différentes couleurs représentent des groupes orthologues. Les carrés rouges représentent des duplications, alors que les cercles verts représentent des événements de spéciation. Les protéines expérimentalement caractérisées sont indiquées par des points rouges, dont : les enzymes CGL, CBL, et CGS de *B. subtilis* (BSU_yrhB_CGL, BSU_yjcJ_CBL et BSU_yjcI_CGS, respectivement) ; CBL/CGL de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 et NIZO B78 (LLC1_MetC et LLC2_MetC, respectivement) ; MetB de *L. casei* (LCA_MetB), et CGS de *Streptococcus anginosus* (SAN_CGS), ainsi que l’OAHS (gène *cysD*) d’*Emericella nidulans* (NAI_CysD) (issu de Liu et al., 2008).

Cependant aucune CBS n’a été formellement identifiée chez *L. casei*. Les génomes de *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* et *L. helveticus* présentent des gènes codant pour une protéine similaire à une cystéine synthase en amont de gènes homologues à *ctl1/ctl2*, ce qui laisse supposer que ces cystéine synthases pourraient également avoir une activité CBS. Un des exemples les plus récents de CBS caractérisée et distincte des cystéine synthases, bien qu’appartenant à la même famille d’enzymes à PLP que ces dernières, est l’enzyme MccA (ex-YrhA ; Uniprot ID : O05393) de *B. subtilis*¹⁰⁹. Chez cet organisme où l’enzyme CysK est bien présente, les deux protéines n’ont que 35% d’identité. L’activité cystéine synthase de CysK est 100 fois supérieure à celle de MccA, et le temps de génération du mutant $\Delta cysK$ sur sulfate est passé de 60 à 500 min par rapport à la souche sauvage, tandis que le mutant $\Delta mccA$ n’a pas été affecté par rapport au phénotype sauvage. En présence d’homocystéine et de sérine, aucune cystathionine n’a été produite que ce soit avec l’une ou l’autre de ces enzymes, mais une activité CBS a été obtenue avec YrhA en présence d’OAS en remplacement de la sérine. De plus, alors que la croissance de $\Delta cysK$ est similaire au WT sur L-méthionine, celle du mutant $\Delta mccA$ est

fortement affectée, confirmant son implication physiologique dans la voie de transsulfuration réverse. Hullo et al., les auteurs de cette étude, ont également exploré l'activité CGL avec MccB (ex-YrhB ; Uniprot ID : O05394)¹⁰⁹. Bien que ni la formation de cystéine ni celle de l'homocystéine n'ait pu être mise en évidence lorsque MccB est mise en présence de cystathionine, celle-ci est bien dégradée comme l'atteste sa disparition après incubation avec l'enzyme. La détection de H₂S après incubation avec cystathionine ou avec cystéine suggère que MccB agit bien comme une CGL et qu'elle possède aussi une activité cystéine désulfhydrase. L'ajout du produit de dégradation de la CTT dans une culture d'un double mutant $\Delta cysK/cysM$ d'*E. coli* auxotrophe à la cystéine a par ailleurs permis une faible croissance des bactéries, ce qui semble en accord avec les observations *in vitro*. MccB semble également catalyser la désulfhydratation de la L-homocystéine, mais pas celle de la méthionine car aucune activité MGL n'a été détectée pour cette enzyme. Enfin la croissance très affectée du mutant $\Delta mccA$ sur méthionine, et nulle sur le double mutant $\Delta mccA/cysK$ alors que ce même double mutant croît sur cystathionine, a permis aux auteurs de confirmer l'ensemble de leurs observations et d'affirmer en plus que la biosynthèse de cystéine à partir de cystathionine ne passe pas par l'homocystéine. Et donc que MccB est une CGL et pas une CBL. Néanmoins, le triple mutant $\Delta cysK\Delta mccAB$ est encore capable de synthétiser de la cystéine à partir de cystathionine et le mutant $\Delta mccB$ croît normalement sur homocystéine ou méthionine, suggérant l'existence d'une voie court-circuitant l'activité CGL de MccB.

Chez les protéobactéries, très peu d'exemples d'enzymes de la voie de transsulfuration réverse ont été étudiés. C'est cependant le cas d'*Helicobacter pylori* SS1, chez qui la protéine NP_222820.1 annotée comme cystéine synthase CysK est impliquée dans la voie de transsulfuration réverse en tant que CBS. En effet, le mutant $\Delta cysK$ ne s'est ni développé dans leur milieu défini sans L-cystéine, ni dans le milieu avec homocystéine, tandis qu'une croissance a été observée en présence de L-cystathionine, suggérant que l'enzyme est nécessaire à la formation de cette dernière. De plus, le mutant a accumulé de la L-homocystéine, suggérant qu'il s'agit bien du substrat de l'enzyme²⁶⁸. Enfin, sur les deux souches testées d'*H. pylori* (1637 et J99), tous les gènes du cluster *cysK-metB-luxS* se sont avérés essentiels pour la prototrophie à la cystéine ; de plus, le fait que *H. pylori* ne croît pas sur H₂S suggère, selon Doherty et al., que CysK est uniquement dédiée à la conversion de l'homocystéine en CTT et pas à la synthèse de la cystéine. À noter que pour le génome de *Helicobacter pylori*, le numéro d'accèsion donné pour cette enzyme, NP_222820.1, a été changé en WP_000603993.1 puis supprimé. La séquence restant néanmoins disponible dans Uniparc, représentée par la protéine Q9ZMW6 annotée comme CysM, ajoutant à la confusion.

Il a été montré pour la seconde partie de cette voie, que MetB de *H. pylori*, démontrée comme étant une CGS impliquée dans la voie de transsulfuration par Kong et al.⁹², s'avère selon Doherty et al. également impliquée dans la voie de transsulfuration réverse, en convertissant la CTT en L-cystéine (activité CGL)²⁶⁸.

Les gènes *cysK* et *MetB* sont co-localisés chez *H. pylori* mais ce cluster ne se retrouve pas en synténie chez les autres espèces d'*Helicobacter*, tandis que des clusters similaires existent dans un certain nombre de bactéries Gram positives (dont *Oceanobacillus iheyensis*, *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*). Curieusement, chez plusieurs espèces de *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. cereus*, *B. anthracis*...) des clusters analogues contiennent le gène *pfs* au lieu de *luxS*, laissant penser qu'au cours de l'évolution, l'ancêtre commun de *H. pylori*/*H. acinonychis* a perdu son gène natif *luxS* et a acquis à la place un gène homologue de bactérie Gram positive, ainsi que la capacité à générer de la cystéine²⁶⁸.

Compte tenu de la complexité de l'assignation des fonctions physiologiques aux enzymes de ces voies, il paraît indispensable de tester expérimentalement les prédictions. Une façon de déterminer si la voie de transsulfuration réverse est la voie privilégiée par un organisme pour recycler la méthionine en cystéine peut être de réaliser des expériences de croissance en présence d'inhibiteur ciblant certaines voies. Cela est possible avec le sélénate de sodium, composé connu pour être un inhibiteur efficace de la biosynthèse de la cystéine. Ce composé exerce son effet inhibiteur en bloquant l'assimilation des sulfates, agissant soit au niveau des transporteurs de sulfates, soit de l'enzyme ATP sulfurylase^{137,269}. Cette méthode a par exemple été testée chez l'entérobactérie *E. coli*. Celle-ci ne croît que faiblement sur L-méthionine, démontrant que c'est une mauvaise source de soufre pour *E. coli* qui ne possède pas de voie de recyclage efficace de la méthionine. Néanmoins en présence de sélénate, la faible croissance est totalement interrompue, ce qui a suggéré aux auteurs l'existence probable d'une désulfhydratation de la méthionine, conduisant à la production de sulfate inorganique¹³⁷. Chez les *Pseudomonas*, la voie de transsulfuration réverse semble être présente chez *P. aeruginosa* mais pas chez *P. putida*. En effet, les deux espèces croissent de la même manière sur L-méthionine, le sélénate n'affectant pas la croissance de *P. aeruginosa* mais ralentissant celle de *P. putida*. Aucune activité CGL n'ayant été mise en évidence chez *P. putida*, l'existence d'une voie réverse a été écartée¹³⁷. Comme nous le verrons ultérieurement, en effet *P. putida* réalise le recyclage de la L-méthionine par une autre voie, via le méthanethiol. Ainsi le ralentissement serait dû en fait à l'action partielle d'inhibition du sélénate sur une des enzymes de cette voie, à moins qu'une voie encore jamais décrite ne permette de produire des sulfates à partir du méthanethiol.

Nagasawa et Kanzaki sont à l'origine de la première étude sur la voie de transsulfuration réverse chez les actinomycètes. Leurs expériences ont confirmé la large distribution des CGL dans 7 genres d'actinomycètes : *Micromonospora*, *Micropolyspora*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Streptosporangium*, and *Streptoverticillium*. Les auteurs ont pu mettre ainsi en évidence une voie complète chez *Streptomyces phaeochromogenes*²⁷⁰. Premièrement, l'activité CBS a été mesurée sur extrait brut bien que l'enzyme n'ait pu être purifiée. Ensuite, la caractérisation d'une CGL purifiée sur CTT ainsi que plusieurs analogues, dont l'acide L-djenkolique, la DL-lanthionine, la L-cystine et la S-méthyl-L-cystéine pour les substrats les mieux pris en charge, a suggéré que cette CGL catalyse à la fois des réactions d' α,β - et d' α,γ -éliminations. Cependant l'activité lyase en présence d'homosérine de cette CBL s'est révélée supérieure. Une autre actinobactérie, *Mycobacterium tuberculosis*, semble également posséder cette voie réverse : bien que l'activité CBS n'ait pas été étudiée, Wheeler et al. ont démontré que *M. tuberculosis* possède bien une activité CGL et que le gène *metB*, codant pour une CGS comme l'ont montré des expériences de complémentation chez le mutant *E. coli* $\Delta metB$, semble en être responsable. Les principales preuves expérimentales de cette double activité sont : (1) le mutant $\Delta metB$ de *M. tuberculosis*, dont la croissance est affectée sur méthionine comme source de soufre ; (2) l'accumulation de cystathionine chez ce même mutant, et son incapacité à incorporer le soufre de la méthionine dans la synthèse de mycothiol (composé thiol majeur chez les Actinobactéries, partageant de nombreuses fonctions avec le glutathion des eucaryotes et des autres classes de bactéries mais absent chez les Actinobactéries) ; (3) la détection des deux activités CGS et CGL sur lysats du mutant *E. coli* $\Delta metB$ complémenté avec *metB*_{*tuberculosis*}²⁷¹.

Chez les archées, l'enzyme issue du gène *cysO* possède également une double activité CBS/OASS. Cette CBS, isolée d'*Aeropyrum pernix* (CysO_{*pernix*}, Uniprot ID : Q9YBL2) et décrite en 2003 par Mino et Ishikawa, catalyse la formation de CTT à partir d'homocystéine et de sérine, et ce de manière équivalente à son activité OASS²⁷². Les auteurs en ont conclu que cette OASS présenterait les

propriétés d'une enzyme ancestrale qui aurait ensuite divergé pour se spécialiser dans les deux voies de biosynthèse de la cystéine, cystéine synthase et transsulfuration réverse.

Le cas des CGL semble quant à lui plus complexe, puisque leur activité suggère une grande promiscuité de substrats et, selon les lignées évolutives, des enzymes bifonctionnelles (CBL/CGL) voire multifonctionnelles (CGS/CBL/CGL), certaines présentant même une activité méthionine γ -lyase plus ou moins forte comme cela semble être le cas chez les bactéries lactiques.

Enfin chez les eucaryotes, cette voie existe également notamment chez les levures comme nous l'avons déjà évoqué chez qui elle représente la seule voie de biosynthèse de la L-cystéine²⁷³. C'est le cas par exemple chez *S. cerevisiae*, qui possède également la voie complète de transsulfuration réverse avec les gènes *cys4* et *cys3*. La CBS Cys4 (Uniprot ID : P32582) s'est en outre avérée similaire à 72% à son homologue humain²⁷³ (CBS_{sapiens}, Uniprot ID : P35520), enzyme qui contient un hème. Les auteurs ont trouvé que Cys4 nécessitait du PLP pour son activité, mais, contrairement à ce que l'on pensait avant l'étude de Maclean et al. (2000), elle ne nécessite pas d'hème²⁷⁴. Enfin, elle catalyse aussi la synthèse de la L-cystéine à partir d'H₂S et d'O-acétyl-L-sérine²⁷⁵. La CGL Cys3 a également été clonée, purifiée et caractérisée²⁷⁶ et s'est montrée être aussi multi-fonctionnelle avec un certain nombre d'activités liées à la cystathionine, y compris CBL et CGS.

1.3.2.3 Les voies de déméthylation/déméthiolation et méthanethiol

Pour être réutilisé par la cellule, le soufre contenu dans la méthionine ou le KMBA doit être fortement réduit pour arriver à la forme primordiale assimilable par les bactéries, le H₂S (figure 57). Ce recyclage implique une décarboxylation/décarbonation de l'une ou l'autre de ces deux sources de soufre via diverses réactions de déméthylation ou de déméthiolation, permettant de produire du méthanethiol. Le méthanethiol, aussi appelé méthylmercaptan, est un gaz naturel incolore, à l'odeur désagréable, très toxique et volatil. Ce métabolite reste néanmoins une très bonne source de soufre pour les bactéries, car il peut ensuite être soit méthylé et oxydé avant d'être réduit, soit directement réduit en H₂S (pour une revue, voir Sekowska et al., 2004). Dans les sections suivantes, nous allons ainsi détailler les voies de recyclage du méthanethiol et ses variantes.

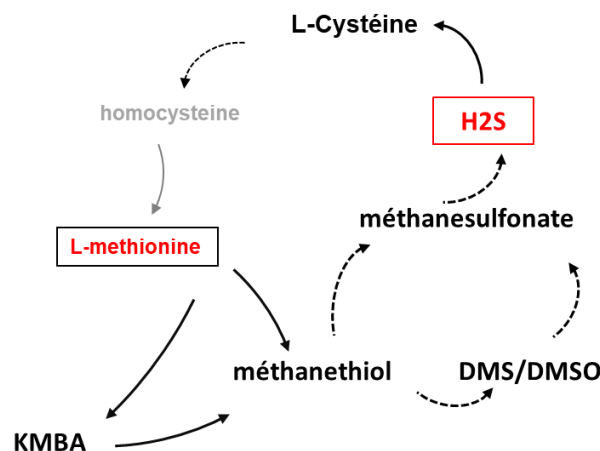


Figure 57 : Voie de recyclage de la méthionine via le méthanethiol. Les molécules clés ont été indiquées sur le schéma. Les flèches en pointillé indiquent plus d'une réaction.

1.3.2.3.1 Etape I : synthèse du méthaneéthiol

Cette étape de synthèse du méthaneéthiol est commune aux différentes voies ou variantes qui existent pour recycler la méthionine en H₂S. Il existe cependant à notre connaissance deux voies principales possibles pour réaliser la synthèse du méthaneéthiol à partir de la L-méthionine chez les bactéries (figure 57 précédant) : celle directe catalysée par les méthionine γ -lyases ou méthioninases (MGL, EC 4.4.1.11), soit celle qui passe par le KMBA synthétisé grâce à une méthionine transaminase, intermédiaire du cycle de Yang comme nous l'avons déjà vu. Cependant des variantes semblent exister notamment chez les bactéries lactiques dont certaines sont montrées sur la figure 58.

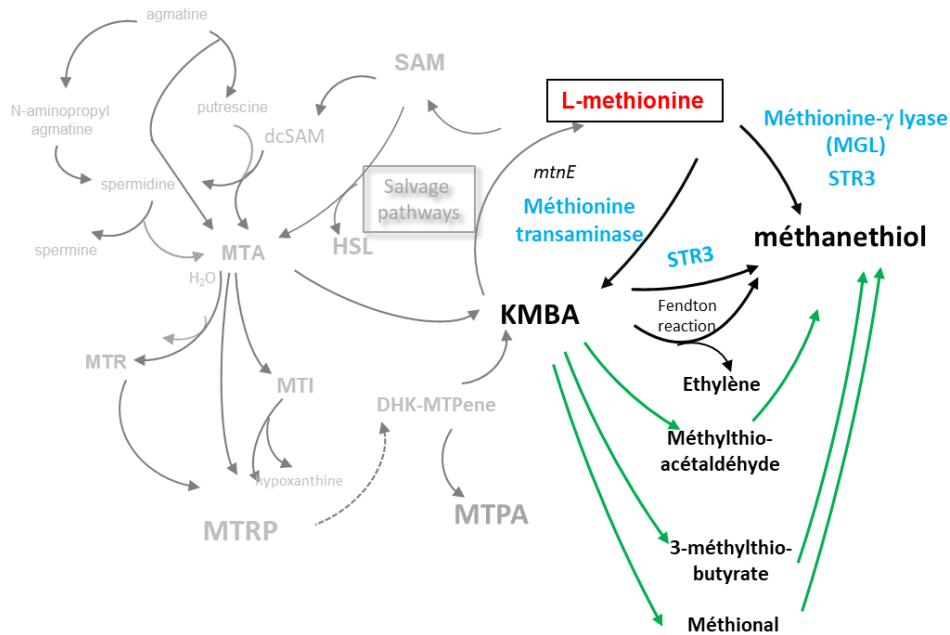


Figure 58 : Biosynthèse du méthaneéthiol dans la voie de recyclage du soufre. STR3 est la déméthiolase de *Clonostachys rosea*, qui a une activité KMBA thiolase (Li et al., 2016). Les voies en vert correspondent à quelques unes des voies proposées chez les bactéries lactiques.

- **Voie directe de synthèse du méthaneéthiol**

Les MGL de la voie directe sont des enzymes à PLP de type I effectuant le clivage de la liaison C γ -S de la méthionine (γ -élimination), générant du méthaneéthiol d'une part et une énamine instable d'autre part (figure 59). Comme pour l'énamine formée lors de la réaction d'une CGL sur la cystathionine, la tautomérisation en imine entraîne sa déamination hydrolytique et le relargage d'ammoniac et de 2-oxobutanoate. Elles sont largement distribuées dans le règne bactérien, et plusieurs structures cristallines ont été obtenues chez *P. putida* et *Citrobacter freundii* pour les procaryotes^{277,278}. Chez l'ascomycète *Bionectria ochroleuca*, la déméthiolase STR3 (Uniprot ID : A0A0S3G5B5) avec une activité CBL marquée a été caractérisée²⁷⁹.

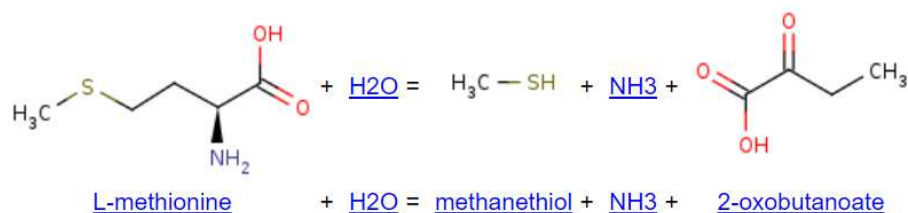


Figure 59 : Réaction catalysée par la méthionine γ -lyase (4.4.1.11). Source : Brenda-enzymes.

La MGL de référence dans la littérature est celle, tétramérique, de *P. putida* (MGL_{*putida*}, Uniprot ID : P13254), qui se trouve en réalité être une enzyme multicatalytique, codée par le gène *mdeA*. En effet, sa fonction principale est de catalyser l' α,γ -élimination de la L-méthionine et aussi de divers thiols. Cependant, elle peut également catalyser les réactions de γ -substitution, de β -élimination et de β -substitution de la L-cystéine et de ses dérivés^{280,281}. Elle présente par ailleurs une homologie de séquence avec d'autres enzymes à PLP bien connues, comme les CGL, CGS, OAHS ou encore OASH²⁸². En 2000, Bonnarme et al. ont étudié le catabolisme de la méthionine chez plusieurs bactéries impliquées dans la maturation de divers fromages. Ils ont pu mettre en évidence sur extraits cellulaires une forte activité MGL sur *Brevibacterium linens* (MGL_{*linens*}, Uniprot ID : Q5MQ31), importante sur *Micrococcus luteus* et *Arthrobacter*, et faiblement active chez *C. glutamicum* et *Staphylococcus equorum*. En parallèle, une forte activité méthionine transaminase (Met-TAM), menant à la biosynthèse du KMBA, a été mesurée sur les extraits de *B. linens*, *M. luteus* et *C. glutamicum*, montrant ainsi que les deux voies de dégradation de la méthionine peuvent coexister chez ces organismes²⁸³.

La MGL_{*linens*} a été purifiée sur activité en 1998 par Dias et Weimer qui, en testant un large panel de molécules soufrées, ont noté une activité lyase 1,3 fois supérieure sur L-homocystéine, précurseur de la L-méthionine, et suggéré un rôle régulateur de cette enzyme²⁸⁴. En 2004, Amarita et al. ont localisé et identifié le gène *mgl* correspondant en utilisant des primers incluant des nucléotides conservés chez les MGL connues (5'-TN₇AANCANATGAN₈GG-3', avec N une base quelconque). Ils ont cependant remarqué que la séquence protéique de MGL_{*linens*} (Uniprot ID : Q5MQ31) était plus proche des CGS (46 à 47 % d'identité) et des CBL/CGL (43 à 45 %) de ces 5 bactéries de référence, que de leur MGL (35 à 39 % d'identité). Les auteurs ont confirmé l'activité MGL_{*linens*} physiologique en inactivant le gène *mgl*, ce qui a eu pour conséquence de diminuer drastiquement la quantité de méthanethiol et d' α -cétobutyrate produits, suggérant néanmoins qu'il existe au moins une isoenzyme capable de catalyser cette réaction. Cependant, dans la souche sauvage, ils n'ont pas observé d'accumulation de l' α -cétobutyrate mais une conversion de celui-ci en α -acéto- α -hydroxybutyrate, suggérant que le catabolisme de la méthionine chez *B. linens* est relié au métabolisme énergétique et à la biosynthèse de l'isoleucine²⁸⁵.

Organisme	Classe	Uniprot ID	Gène	Article associé
<i>Pseudomonas putida</i> (<i>Arthrobacter siderocapsulatus</i>)	γ-Protéobactéries	P13254	<i>mdeA</i>	Ito S et al. (1976) Esaki et al. (1987) Vermeij et Kertesz (1999)
<i>Pseudomonas putida (ovalis)</i>				Tanaka et al. (1977) Inoue et al. (1995)
<i>Citrobacter intermedius</i>				Faleev et al. (1996)
<i>Brevibacterium linens</i> BL2	Actinobactéries	Q5MQ31	<i>mgl</i>	Dias et Weimer (1998) Amarita et al. (2004)
<i>Micrococcus luteus</i>		nc		Bonnarme et al. (2000)
<i>Arthrobacter sp.</i>		nc		
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		nc		
<i>Staphylococcus equorum</i>	Bacilli	nc		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Bacteroidia	Q7MX71	<i>mgl</i>	Yoshimura al. (2000) Revtovich et al. (2012)
<i>Treponema denticola</i>	Spirochaetes	Q73KL7	<i>megL</i>	Fukamachi et al. (2005)
<i>Citrobacter freundii</i>	γ-Protéobactéries	Q84AR1	<i>megL</i>	Manukhov et al. (2005)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fusobactéries	Q8RDT4	<i>fn1419</i>	Suwabe et al. (2011)
<i>Idiomarina loihiensis</i>	γ-Protéobactéries	Q5QU17 ?	<i>IL0726 ?</i>	brevet CN101962651A (2011)
<i>Clostridium tetani</i>	Clostridia	Q890V5	<i>CTC_02530</i>	Revtovich et al. (2012)
<i>Clostridium sporogenes</i>		J7TA22	<i>megL</i>	
<i>Micromonospora echinospora</i>	Actinobactéries	Q8KNG3	<i>calE6</i>	Song et al. (2015)

Tableau 3 : Bactéries pour lesquelles une activité MGL a été décrite dans la littérature.

Bien d'autres activités MGL ont été décrites (cf. tableau 3 ci-dessus), catalysées par des enzymes très diverses (figure 60), tantôt sur extraits cellulaires, tantôt sur enzymes purifiées. La difficulté principale pour étudier ces enzymes réside dans le fait que dans bien des cas l'activité MGL semble être une activité secondaire d'enzymes impliquées dans d'autres voies métaboliques. En effet, comme l'ont rappelé Sato et Nozaki en 2009, il a souvent été observé chez les MGL des activités de β-élimination sur cystéine (CD), voire de β-substitution (CGS), ainsi que de γ-élimination sur divers substrats soufrés, dont bien sûr la méthionine⁸. Et réciproquement, comme avec les CGL d'*O. oeni* et de *L. casei* qui semblent présenter une légère activité MGL. Néanmoins, malgré cette large spécificité de substrat, certaines MGL présentent une spécificité éprouvée vis-à-vis de certains substrats, comme cela a été montré par exemple avec la MGL de *Fusobacterium nucleatum*, enzyme ne dégradant que très peu la L-cystéine²⁸⁶.

UniProt ID	Organisme	Classe	Matrix Identity										
tr Q8KNG3 Q8KNG3_MICEC	<i>Micromonospora echinospora</i>	Actinobactéries	100	40,59	34,83	37,63	40	36,24	36,15	36,24	37,11	38,16	
tr Q5MQ31 Q5MQ31_BRELN	<i>Brevibacterium linens</i>	Actinobactéries	40,59	100	37,08	38,7	42,49	39,95	39,22	38,12	39,12	38,6	
tr Q5QU17 Q5QU17_IDILO	<i>Idiomarina loihiensis</i>	γ-Protéobactéries	34,83	37,08	100	47,1	49,87	49,75	48,24	51,91	52,27	52,9	
sp P13254 MEGL_PSEPU	<i>Pseudomonas pudia</i>	γ-Protéobactéries	37,63	38,7	47,1	100	51,39	55,81	54,16	53,81	55,56	52,9	
tr Q84AR1 Q84AR1_CITFR	<i>Citrobacter freundii</i>	γ-Protéobactéries	40	42,49	49,87	51,39	100	57,72	57,93	58,12	57,93	55,53	
sp Q7MX71 MEGL_PORGI	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Bacteroidia	36,24	39,95	49,75	55,81	57,72	100	74,19	64,72	67,59	68,01	
sp Q73KL7 MEGL_TREDE	<i>Treponema denticola</i>	Spirochaetes	36,15	39,22	48,24	54,16	57,93	74,19	100	67,09	66,75	68,67	
sp Q8RDT4 MEGL_FUSNN	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fusobactéries	36,24	38,12	51,91	53,81	58,12	64,72	67,09	100	68,86	67,09	
tr Q890V5 Q890V5_CLOTE	<i>Clostridium tetani</i>	Clostridia	37,11	39,12	52,27	55,56	57,93	67,59	66,75	68,86	100	72,86	
tr J7TA22 J7TA22_CLOS1	<i>Clostridium sporogenes</i>	Clostridia	38,16	38,6	52,9	52,9	55,53	68,01	68,67	67,09	72,86	100	

Figure 60 : Diversité des séquences des MGL décrites dans la littérature illustrée par une matrice d'identité. Matrice construite par alignement des séquences avec Clustal omega.

- **Voie de synthèse du méthaneéthiol via le KMBA**

La deuxième voie passe par la synthèse de KMBA. Cette première étape est réalisée par une méthionine transaminase (Met-TAM ; EC 2.6.1.88). L'existence de cette voie est basée sur l'observation de la formation de KMBA et de méthaneéthiol à partir de méthionine chez *Clonostachys rosea* par exemple (Jia et al., 2016) ou un certain nombre de bactéries lactiques. Il est souvent admis que l'activité de transamination peut être potentiellement catalysée par la dernière enzyme du cycle MTA qui a un large spectre de substrats, MtnE (ou TyrB, IlvE ou BCAT selon les organismes). Ici, le donneur d'amine n'est pas la glutamine mais la méthionine, l'accepteur étant un 2-oxocarboxylate (par exemple, l' α -cétoglutarate ou l' α -cétoglutaramate). À notre connaissance, aucune enzyme spécifique de cette voie n'a encore été mise en évidence.

La déméthiolase STR3, enzyme de type CBL, de *Clonostachys rosea* déjà décrite précédemment, catalyse la formation de méthaneéthiol à partir de KMBA (Li et al., 2016). L'existence de cette activité KMBA déméthiolase laisse imaginer également que le KMBA, qui peut être produit à partir du cycle du MTA (sans passer par la méthionine), pourrait également être une variante directe de recyclage. À notre connaissance, aucune enzyme correspondant à l'activité KMBA déméthiolase n'a encore été décrite chez les procaryotes bien que l'activité sur extraits cellulaires a, comme nous l'avons vu, déjà été observée.

L'enzyme fongique, STR3 (UniProt ID : P53101), annotée comme étant une CBL, a été caractérisée et les auteurs ont montré que son substrat physiologique est bien la cystathionine (100 % d'activité relative), mais surtout que STR3 est également responsable de la déméthiolation du KMBA (40 %) et dans une moindre mesure de la méthionine (10 %). Ce résultat est par ailleurs en accord avec les données génétiques et métabolomiques accumulées par ces auteurs, suggérant que STR3 est une enzyme déterminante dans la conversion de la L-méthionine en méthaneéthiol via le KMBA²⁷⁹.

Chez *Lactococcus lactis*, des expériences avec de la L-méthionine radiomarquée ont conduit à mettre en évidence une variante de cette voie avec la formation de méthaneéthiol à partir de KMBA mais également de méthylthioacétaldéhyde (figure 61)²⁸⁷. La présence d'α-cétoglutarate est nécessaire à la formation de ces produits, confirmant l'essentialité des transaminases AraT²⁸⁸ et BcaT²⁸⁹ identifiées antérieurement. Ils ont montré qu'ensuite le méthaneéthiol était dégradé au moins en DMS chez *L. lactis*.

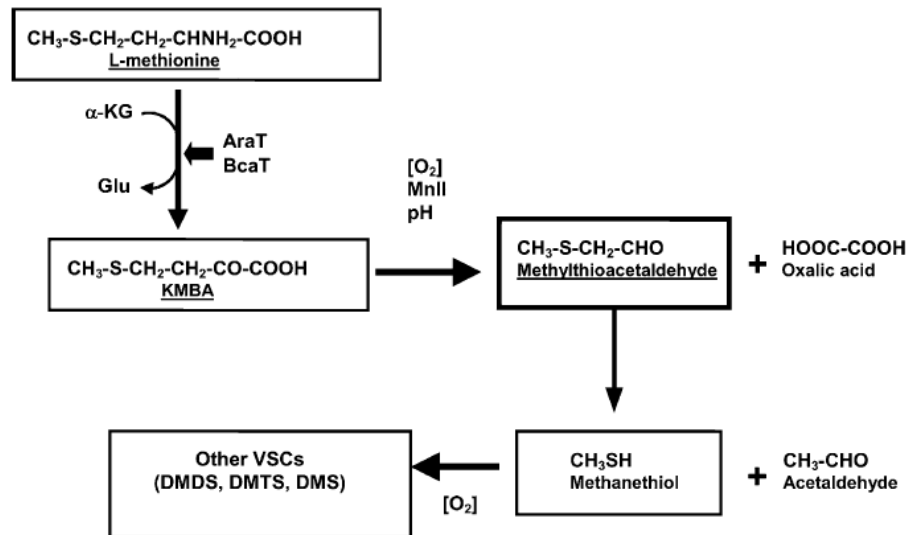


Figure 61 : Voie métabolique proposée par Bonnarne chez *L. lactis* sp. Cremosis via la formation de méthylthioacétaldéhyde. α-KG: α-cétoglutarate; Glu: glutamate; AraT: aromatic aminotransferase; BcaT: branched chain aminotransferase (issu de Bonnarne et al., 2004).

Enfin, une voie non-enzymatique de biosynthèse du méthaneéthiol à partir du KMBA a été trouvée en parallèle d'une voie alternative de biosynthèse de l'éthylène ; en outre, il s'avère que la plupart des microorganismes produisent seulement quelques traces d'éthylène via cette voie. Ceci est dû au fait que l'éthylène y est produit non enzymatiquement via l'action de radicaux hydroxyles qui sont formés à partir de l'oxygène moléculaire (O_2) par le biais d'une NADH:Fe(III)EDTA oxydoréductase. Cette production d'éthylène à partir de méthionine par certains organismes microbiens a été observée dès les années 1960s. Par ailleurs, il a été montré que la peroxydase de raifort pouvait catalyser la conversion du 3-méthylthiopropenal ou du KMBA en éthylène²⁹⁰. L'enzyme qui facilite cette conversion a ensuite été décrite chez *E. coli* B SPAO, celle-ci nécessitant de l'oxygène et du PLP²⁹¹. Cette enzyme a été étudiée plus en détail, et décrite comme une protéine soluble qui nécessite du NAD(P)H , du Fe^{3+} chélaté à l'EDTA, et de l'oxygène. Les produits de la réaction comprennent non seulement l'éthylène, mais aussi le méthaneéthiol et le CO_2 ²⁹².

Il convient de noter qu'en conditions physiologiques, le Fe^{3+} est souvent en complexe avec les sidérophores ; ceux-ci constituent de petits composés chélatant à haute affinité envers le fer. Une fois en dehors de la cellule, les sidérophores lient les ions Fe^{3+} avec une très forte affinité pour former un complexe, qui est ensuite importé dans la cellule via des mécanismes de transport actif. La plupart des sidérophores appartiennent à l'un de ces 3 groupes majeurs : les catéchols, les hydroxamates et les thiazolines. Ils sont très répandus parmi les bactéries pathogènes, notamment du fait que, chez la plupart des organismes hôtes, le fer est habituellement étroitement lié à des protéines, ce qui a pour

conséquence de diminuer drastiquement la concentration en fer libre dans le sang.

La première étape de cette voie, catalysée par la NADH:Fe(III)EDTA oxydoréductase, enzyme purifiée à partir du champignon *Cryptococcus albidus*, produit du fer ferreux (Fe^{2+}) qui réagit chimiquement avec l'oxygène moléculaire en formant des radicaux superoxydes (figure 62). Ce radical est transformé en peroxyde d'hydrogène par une superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène réagit également avec le fer ferreux via la réaction de Fenton, produisant un radical hydroxyle. Enfin, le radical hydroxyle réagit avec le KMBA, générant de l'éthylène, du méthanethiol et du CO_2 ²⁹³. Il est parfois indiqué que la production d'éthylène dans la plupart des microorganismes dépend uniquement de la présence de la transaminase spécifique (type MtnE) catalysant la formation de KMBA en L-méthionine, car les enzymes qui peuvent catalyser la production de radicaux hydroxyles sont ubiquitaires²⁹⁴. Sans oublier également l'existence des Met-TAM, catalysant la réaction inverse de conversion de la L-méthionine en KMBA décrite précédemment.

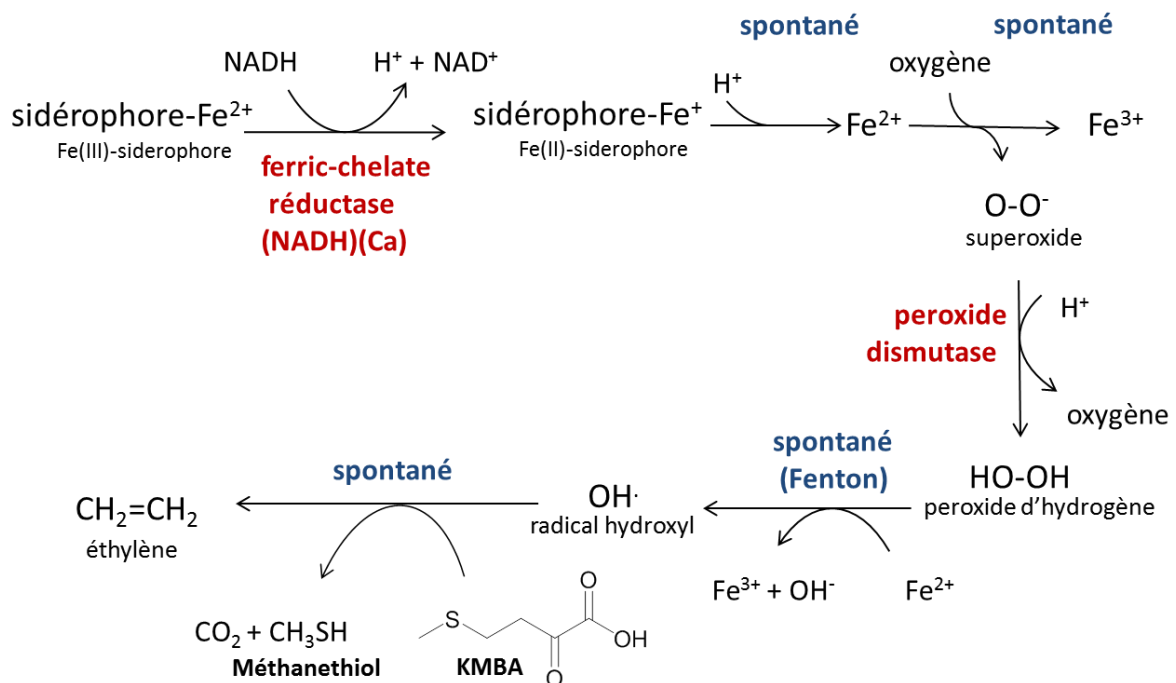


Figure 62 : Couplage de la réaction de Fenton et de la biosynthèse de méthanethiol à partir de KMBA.

Chez les bactéries lactiques, de nombreuses voies ont été proposées, également sur la base de la détection des molécules soufrées, mais nous ne les développerons pas ici. En 1999, le schéma suivant (figure 63) était proposé par Konings et ses collaborateurs, auteurs du livre «Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications»²⁹⁵. Celui-ci montre que la méthionine et le KMBA sont les précurseurs de nombreuses molécules soufrées volatiles. Il comporte néanmoins une erreur, la décarboxylation du KMBA (réaction 14) menant à la formation de méthional et non pas à celle de 3-méthylthiobutyrate.

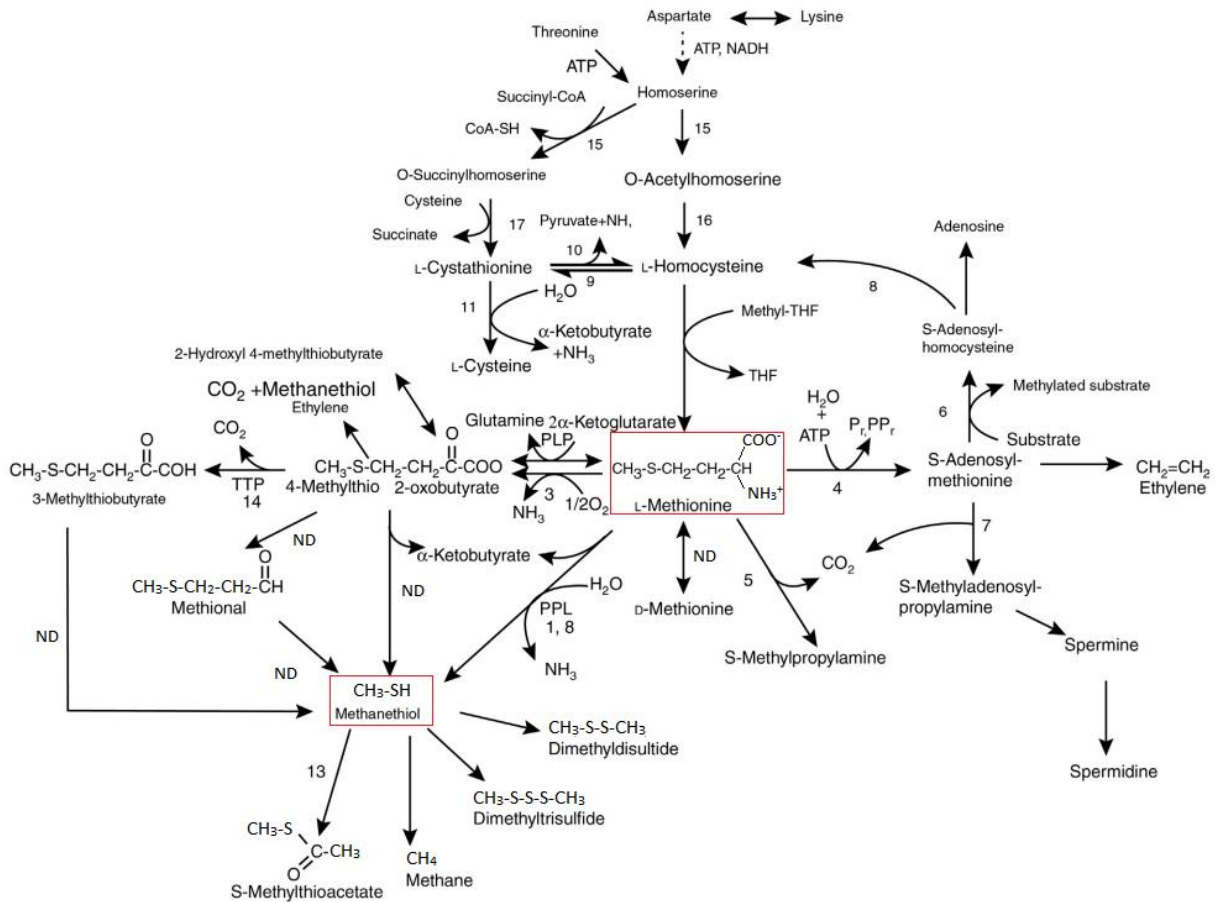


Figure 63 : Diverses voies de recyclage et de synthèse de molécules sulfurées volatiles à partir de la méthionine chez les bactéries lactiques (issu de « Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications, Book W.N. Konings, 1999). Les enzymes impliquées sont : (1) MGL, (2) amino-acide oxydase, (3) Met-TAM, (4) méthionine adénosyl transférase, (5) methionine décarboxylase, (6 & 8) adénosyl homocystéinase, (7) SAM décarboxylase, (9) CBS, (10) CBL, (11) CGL, (12 and 16) homocystéine méthyltransférase, (13) acyltransférase, (14) décarboxylase, (15) homosérine O-acétyltransférase, et (17) CGS.

1.3.2.3.2 Etape 2 : du méthanethiol au DMS

La conversion en une seule réaction du méthanethiol en H₂S peut être réalisée directement via son oxydation. Cette activité a été décrite dès 1987 chez *Hyphomicrobium* EG²⁹⁶ et existe également chez les mammifères²⁹⁷. Chez les bactéries aérobies oxydant le soufre, ainsi que les méthylotrophes impliquant les genres *Thiobacillus*²⁹⁸, *Rhodococcus*²⁹⁹ et *Hyphomicrobium*²⁹⁶, le méthanethiol est dégradé par une méthanethiol-oxydase (MTOx ; EC 1.8.3.4) en formaldéhyde, H₂S et peroxyde d'hydrogène (figure 64). Cependant, les données des différentes études semblent peu cohérentes avec l'existence d'un seul type d'enzyme. En effet, les masses moléculaires estimées des MTO caractérisées se situent entre ~29 et 61 kDa. La MTOx de *Hyphomicrobium* sp. EG a été décrite comme étant un monomère de 40-50 kDa insensible aux agents chélatant²⁹⁶. Chez *Thiobacillus thioparus*, la MTOx

semble également être un monomère, avec un poids moléculaire d'environ 40 kDa ; pourtant, une étude ultérieure de la MTOx de *T. thioparus* a indiqué un poids moléculaire différent, de 61 kDa³⁰⁰. Et pour la MTO de *Rhodococcus rhodochrous*, un poids moléculaire de 64,5 kDa²⁹⁹.

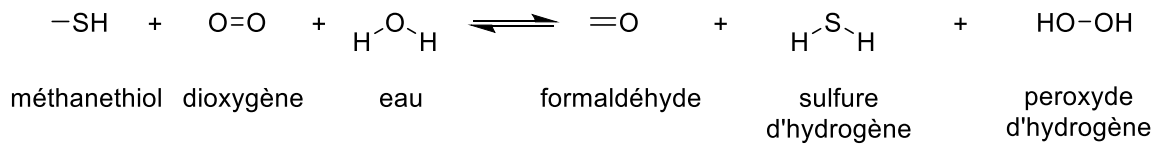


Figure 64 : Réaction catalysée par la méthanethiol oxydase (EC 1.8.3.4).

En 2018, Eyice et al. ont identifié pour la première fois le gène *mtox* codant pour cette enzyme³⁰¹. MTO de *Hyphomicrobium sp.* (Uniprot ID : A0A291P0C1) est une métalloenzyme tétramérique Cu-dépendante. Elle est prédite comme étant une protéine périplasmique soluble et membre d'un clade distinct de la famille des protéines liant le sélénium (SBP56), pour lesquelles aucune fonction n'a été rapportée. Les auteurs ont montré que des gènes orthologues à *mtox* existent dans de nombreuses bactéries capables de dégrader le sulfure de diméthyle (DMS), notamment dans l'organisme modèle marin *Rugeria pomeroyi* DSS-3. La mutation du gène *mtox* (*SPOA0269*) codant pour MtoX_{pomeroyi} (Uniprot ID : Q5LKW0) a perturbé la capacité de *R. pomeroyi* à métaboliser le méthanethiol, confirmant sa fonction dans cette bactérie. MtoX_{pomeroyi} (Uniprot ID : Q5LKW0) et MTO_{hyphomicrobium} partagent 55 % d'identité. De plus, la transcription de *mtox* a été augmentée en présence de méthanethiol. Enfin, la détection d'orthologues de *mtox* dans diverses bactéries, des échantillons environnementaux et leur abondance dans une série de données métagénomiques indiquent que cette enzyme est largement distribuée dans l'environnement et joue un rôle clé dans le cycle global du soufre via la molécule clef qu'est le diméthylsulfoniopropionate (DMSP)

Chez les bactéries, le méthanethiol est en général transformé en DMS grâce à une méthylation (figure 65). Cette réaction de méthylation permettant la conversion du méthanethiol en DMS a été découverte chez *Pseudomonas deceptionensis*, bactérie isolée de sédiments marins prélevés en Antarctique.

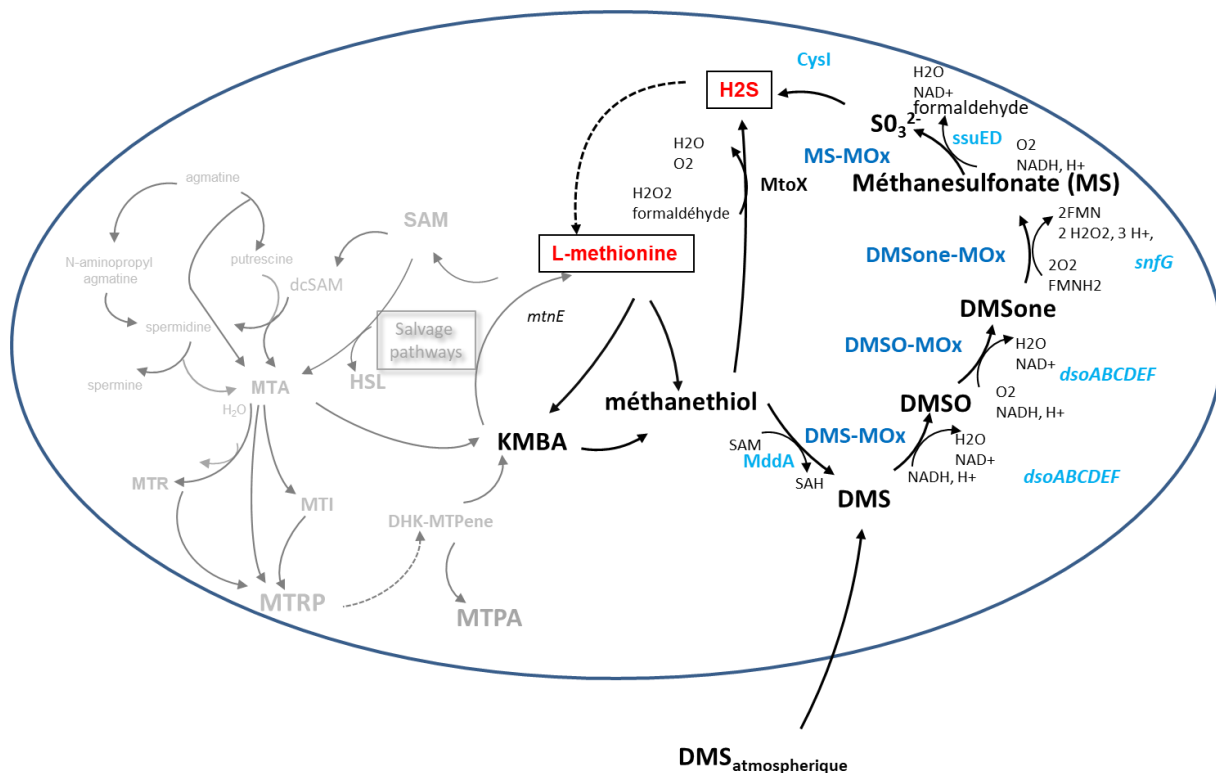


Figure 65 : Voies de recyclage de la L-méthionine pour la production de H₂S chez les bactéries.

Il a été remarqué que *P. deceptionensis* pouvait produire du DMS à partir de L-méthionine ou de méthaneéthiol en conditions oxygènes, alors qu'elle ne synthétise pas ni ne catabolise le DMSP, possible précurseur du DMS. Carrion et al. ont donc supposé en 2015 que cet organisme possédait une voie de production de DMS encore non décrite dans la littérature³⁰². Une banque génomique de *P. deceptionensis* a été préparée à l'aide du cosmide à large gamme d'hôtes pLAFR3 et exprimée dans *Rhizobium leguminosarum* ; les bactéries ont ensuite été criblées en fonction de leur capacité à produire du DMS à partir du méthaneéthiol. Le cosmide provenant d'un clone positif a été soumis à une mutagenèse par transposon, et le gène responsable, nommé *mddA* (Uniprot ID de MddA : A0A0F6P9C0), a été identifié.

Une mutation par insertion dans le gène *mddA* a stoppé la production de DMS, confirmant le lien entre le produit génique et la production de DMS : MddA est une méthaneéthiol S-méthyltransférase (EC 2.1.1.334). La protéine codée par ce gène est similaire à la protéine-S-isoprénylcystéine O-méthyltransférase (EC 2.1.1.100). L'enzyme contient quatre à six hélices potentiellement transmembranaires, laissant penser que la protéine serait membranaire. De plus, le fractionnement subcellulaire de *P. deceptionensis* a montré que l'activité de MddA était présente uniquement dans la fraction membranaire, renforçant cette hypothèse, et qu'elle était dépendante de la SAM.

1.3.2.4 Catabolisme du DMS : vers la production de sulfites et d'H₂S

Une fois le DMS produit, il peut être transformé en H₂S en 6 étapes notamment chez les procaryotes. Bien qu'extrêmement volatile, l'hydrosolubilité du DMS augmente considérablement avec son degré d'oxydation. La voie d'oxygénation du DMS en diméthylsulfoxyde (DMSO), puis en diméthylsulfone (DMSOne), méthanesulfonate et enfin en sulfites (SO₃²⁻), permet aux bactéries de

garder le soufre disponible pour sa réutilisation sous sa forme réduite H₂S. Cette voie de recyclage est commune à la voie d'assimilation du DMS atmosphérique, lui-même étant un produit de dégradation du DMSP comme nous le verrons par la suite.

Il est admis que le DMS est principalement produit par la flore microbienne marine, notamment via la dégradation du DMSP ; pourtant, la quantité de DMS issue des environnements terrestres n'est pas négligeable. Par exemple, les tourbières peuvent émettre jusqu'à 6 µmol de DMS au m² par jour. La voie qui permet ensuite la transformation du DMS en H₂S est alors commune à celle qui permet l'assimilation du DMSP comme nous le verrons ensuite. Le DMS est par ailleurs certainement issu de la méthylation du méthane-thiol sous l'action du gène *mddA*, qui n'est pas uniquement présent chez les bactéries marines. Le gène *mddA* est en effet très abondant dans les métagénomiques issus de milieux terrestres et en particulier dans les sols (prairies, forêts, champs, rizières...), où sa présence est attendue chez 76% des bactéries³⁰².

- **Catabolisme du DMS vers le DMSO₂**

Les gènes codant pour la DMS/DMSO monooxygénase (DMS/DMSO-MOx) ont été étudiés et clonés à partir d'*Acinetobacter sp.* 20B. Ils se sont avérés très similaires aux gènes codant pour la phénol 2-monooxygénase à NADH, une enzyme à plusieurs sous-unités contenant cinq polypeptides différents. Chez *Acinetobacter sp.* la DMS/DMSO-MOx est codée par les gènes de l'opéron *dsoABCDEF* et catalyse les deux premières étapes de la voie d'oxydation du DMS³⁰³ (EC 1.14.13.M46), c'est-à-dire du DMS en DMSO puis du DMSO en diméthylsulfone (DMSO₂) à l'aide de NADPH et d'O₂ (cf. figure 65 générale p.102). L'isolement de cette enzyme a été problématique pendant de longues années, car il n'existait pas de méthode de mesure de l'oxydation du DMS. Cela est devenu possible lorsque les chercheurs ont réalisé que cette enzyme oxydait également l'indole, produisant l'indigo, et permettant ainsi de cribler les clones par la formation de la couleur indigo. Les gènes ont été clonés dans *E. coli*, qui a acquis la capacité d'oxyder à la fois le DMS et le DMSO. Cependant, l'activité était beaucoup plus forte avec le DMS.

Sur la base de sa similitude avec la phénol 2-MOx NADH-dépendante (EC 1.14.13.M20), il a été supposé que le complexe enzymatique comprend trois composants principaux : (1) la DMSO-MOx oxygénase est un homodimère, chaque monomère étant constitué de trois polypeptides différents, DsoE (Uniprot ID : O32432), DsoD (Uniprot ID : O32431) et DsoB (Uniprot ID : O32429). Cette oxygénase contient le site actif et un centre Fe dinucléaire ; (2) la phénol hydroxylase réductase est un monomère (DsoF; Uniprot ID : O32433), bien que son activité maximale nécessite deux de ces monomères par complexe ; (3) la réductase, qui contient quant à elle du FAD et un cluster Fe-S, dont la fonction est le transfert d'électrons du NADPH au centre Fe dinucléaire de l'oxygénase. Le composant régulateur de la DMSO-MOx est un homodimère (DsoC)₂ et il a été démontré qu'il interagissait avec la grande sous-unité du composant oxygénase, *ie* DsoD³⁰⁴. Comme dans le cas de la phénol 2-monooxygénase (NADH-dépendante), l'opéron contient un sixième gène (*dsoA*), qui n'est pas nécessaire à l'activité (DsoA ; Uniprot ID : O32428), et jouerait un rôle dans l'assemblage de la forme active du composant oxygénase^{305,306}.

Chaque mutant de délétion effectué pour les cinq gènes *dsoBCDEF* a conduit à la perte de l'activité. Les mutants de délétion n'ayant plus les gènes *dsoC* et *dsoF*, qui codent respectivement pour les composants régulateurs et réductases, ont pu être complétés avec succès par les gènes *dmp* codant pour des composants homologues de la phénol 2-monooxygénase à NADH chez *Pseudomonas sp.* CF600³⁰⁵. Via la plateforme MicroScope, on peut noter que ce cluster de gènes est assez répandu

chez les γ -protéobactéries mais aussi chez les β -protéobactéries (*Cupriavidus metallidurans* CH34 par exemple) mais peu répandu parmi le genre *Acinetobacter* (excepté *Acinetobacter guillouiae*³⁰⁷ et *A. radioresistens*) et même dans le genre *Pseudomonas* (excepté *Pseudomonas putida* GB-1), et absent de *B. subtilis* ou *L. casei* par exemple, organismes performants en terme de recyclage de la L-méthionine comme nous l'avons déjà évoqué.

Il est intéressant de noter que la voie réverse de réduction du DMSO vers le DMS existe chez *E. coli* grâce aux enzymes anaérobies de l'opéron *dmsABC*, même si ce n'est pas dans le contexte d'une voie de recyclage de la L-méthionine ni d'assimilation de DMS. Ce complexe permet à *E. coli* de croître en anaérobie en utilisant le DMSO comme accepteur final d'électron. La DMSO réductase (EC 1.8.5.3) est une enzyme à molybdène et à cluster Fe-S, appartenant à la famille CISM³⁰⁸ (« Complex Iron Sulfur Molybdoenzyme »), associée à la membrane et qui catalyse la réduction du DMSO en DMS. Le complexe enzymatique contient trois sous-unités non identiques : une sous-unité catalytique, DmsA (Uniprot ID : P18775), avec un cofacteur molybdo-bis (pyranoptérine guanine dinucléotide) (Mo-bisPGD) et un cluster [4Fe-4S] (connu sous le nom FSO) ; une sous-unité dédiée au transfert d'électrons, DmsB (Uniprot ID : P18776), contenant quatre clusters [4Fe-4S] (FS1-FS4) ; et une sous-unité d'ancrage intégralement membranaire (DmsC), requise pour la localisation membranaire du complexe³⁰⁹, stabilisant DmsAB et contenant le site de liaison à la quinone requise pour le transfert d'électron lors de la réduction³¹⁰. Selon Tang et al., ce transfert se produit à partir du site de liaison au ménaquinol dans DmsC (Uniprot ID : P18777), puis via les clusters Fe-S dans DmsB et jusqu'au site de réduction du DMSO dans DmsA³¹¹.

Un autre gène a été identifié comme DMS monooxygénase chez les α -protéobactéries *Methylocella silvestris* et *R. pomeroyi*. Il s'agit de *tmm*, qui permet notamment à *M. silvestris* de croître sur triméthylamine (TMA) comme seule source de carbone et d'énergie. Tmm est une MOx à flavine (FMO), une homologue procaryote aux FMOs eucaryotes, et qui catalyse l'oxygénation de la TMA en TMA N-oxide (EC 1.14.13.148). Tmm peut également oxyder le DMS (EC 1.14.13.M46), et ce avec une valeur de Km similaire à celle du TMA³¹². Une enzyme similaire (Uniprot ID : Q5LT63) a ensuite été rapportée pour l'enzyme de *R. pomeroyi*³¹³. Des homologues proches de Tmm apparaissent dans de nombreuses α -protéobactéries marines, y compris la très commune *C. Pelagibacter ubique*. On estime ainsi que 20% des bactéries des eaux de surface des océans possèdent cette enzyme³¹².

- **Catabolisme du DMSO2 en méthanesulfonate puis sulfite**

La réaction permettant de poursuivre l'oxydation du DMSO2 en méthanesulfonate est catalysée par la DMSO2-MOx, caractérisée à partir de *Pseudomonas spp.* Cette enzyme (Uniprot ID : B0KMK8 ; EC 1.14.14.35) est codée par le gène *snfG* et son fonctionnement dépend de la FMN réductase NAD(P)H-dépendante SfnE (Uniprot ID : B0KMK9 ; EC 1.5.1.42), qui lui confère donc du FMNH₂ (Uniprot ID : B0KMK9). Le produit de cette réaction, le méthanesulfinate, se transforme spontanément en méthanesulfonate en présence de dioxygène et de FMNH₂³¹⁴. Ces gènes sont dans un cluster avec leur régulateur *SfnR*.

La dernière étape d'oxydation permet de transformer le méthanesulfonate en sulfites et formaldéhyde. Cette activité est assurée par des alcanesulfonate monooxygénases (EC 1.14.14.5), des méthanesulfonate monooxygénases FMNH₂-dépendantes (EC 1.14.14.34) ou NADH-dépendantes (EC 1.14.13.111). Plusieurs gènes ont été identifiés comme codant pour ces MOx.

SsuD est une alcanesulfonate-MOx à FMNH₂ à large gamme de substrats ; elle a été purifiée à partir d'*E. coli* (SsuD_{coli} ; Uniprot ID : P80645), qui peut utiliser les alcanesulfonates comme source de soufre pour son développement. Cette MOx est capable de désulfoner les alcanesulfonates C-2 à C-10 non substitués, les acides éthanesulfoniques substitués, la N-phényltaurine, l'acide 4-phényl-1-butanesulfonique et certains tampons sulfonés. Le mutant de délétion Δ ssuD ne peut pas croître sur méthanesulfonate ou L-cystéate comme seule source de soufre³¹⁵. Les meilleurs substrats de SsuD sont l'acide décanesulfonique, l'acide octanesulfonique et l'acide 1,3-dioxo-2-isoindoline-éthanesulfonique³¹⁶. SsuD fonctionne en réalité en complexe enzymatique, lorsqu'elle est couplée à la réductase SsuE (SsuE_{coli} ; Uniprot ID : P80644). En effet, le gène *ssuE* code pour une FMN réductase NADPH-dépendante, qui fournit SsuD en FMN réduit³¹⁶. Gao et al. ont constaté que la présence de SsuD et du substrat octanesulfonate modifie la cinétique de réduction du FMN catalysée par SsuE³¹⁷. D'autres études ont montré la formation d'un complexe stable entre SsuD et SsuE, qui modifie l'environnement de la flavine liée à SsuE³¹⁸ ; ces résultats supportent un modèle de transfert direct de la flavine réduite de SsuE à SsuD. La comparaison de la structure de SsuD à celle proche de la luciférase LuxA a permis l'identification d'un possible site actif³¹⁹. Les études cinétiques indiquent que la liaison ordonnée du substrat, avec la liaison de la flavine réduite en premier, est importante pour l'activité catalytique de SsuD³²⁰. De nombreuses études du site actif et de ses résidus catalytiques ont été réalisées, ainsi que des simulations de dynamique moléculaire de liaison des substrats ou du FMNH₂, mais nous retiendrons seulement ici le fait qu'une région cruciale du site catalytique, composée d'une boucle dynamique, change de conformation lors de la catalyse et semble ainsi protéger le FMNH₂ d'une oxydation intempestive³²¹.

MsuD (Uniprot ID : Q9I1C2) est une méthanesulfonate-MOx à FMNH₂ comportant 4 sous-unités identiques. Cette enzyme, caractérisée à partir de *Pseudomonas aeruginosa*³²², permet à ces organismes d'utiliser le méthanesulfonate comme seule source de soufre. Son activité dépend de MsuE (Uniprot ID : O31038), une FMN réductase NAD(P)H-dépendante codée par un gène provenant du même opéron. MsuD et SsuD partagent 67% d'identité mais la région génomique et leurs réductases correspondantes ne se ressemblent pas. Endoh et al. ont étudié l'oxydation du DMS chez *P. putida* DS1 via des mutants ne pouvant plus utiliser le DMS comme source de soufre. Deux des mutants obtenus avaient une insertion Tn5 dans l'opéron *ssu* qui comprend *msuD*. Le mutant de disruption *msuD* a été construit, et il a été trouvé que MsuD (initialement appelé SsuD) est essentiel pour la désulfonation du DMS dans cette souche. Par ailleurs, comme MsuD partage 31% d'identité avec DszA de *Rhodococcus* sp., sous-unité du complexe DszAB qui catalyse le clivage de la liaison C-S du dibenzothiophène-5,5-dioxyde, une étude a été lancée afin de savoir si MsuD catalyse la désulfonation de l'un des intermédiaires de la voie d'oxydation du DMS chez *P. putida*. Le seul substrat pour MsuD s'est alors révélé être le méthanesulfonate, dans une réaction qui génère du sulfite et du formaldéhyde³²³.

La flavoprotéine MsmABCD est une méthanesulfonate-MOx à NADH composée de plusieurs sous-unités. Contrairement à SsuD, Msm présente une faible promiscuité de substrat puisqu'elle agit seulement sur les sulfonates aliphatiques à chaîne courte (méthane-butanesulfonate) et exclut toutes les molécules plus grosses, telles que les arylsulfonates et les sulfonates aromatiques³²⁴. L'enzyme de l' α -protéobactérie *Methylosulfonomonas methylovora* est un complexe de type [(MsmA)₃(MsmB)₃][(MsmC)₂][MsmD] comprenant une composante hydroxylase (MsmAB), une réductase (MsmD ; Uniprot ID : Q9X406) et une ferrédoxine (MsmC ; Uniprot ID : P70752).

L'hydroxylase possède une grande et une petite sous-unité, respectivement MsmA (Uniprot ID : Q9X404) et MsmB (Uniprot ID : Q9X405). La composante ferredoxine (MsmC) est un dimère de protéine acide (pI = 3,9), qui contient un centre fer-soufre de type Rieske [2Fe-2S]³²⁵ associé à MsmA. Chez *M. methylovora* M2, *msmABCD* est organisé en opéron, tandis que dans la souche TR3 les gènes *msm* sont divisés en deux opérons complémentaires, *msmABC* et *msmABD*, en synténie avec l'opéron similaire trouvé dans la souche M2³²⁴.

Les sulfites issus de l'oxydation et de la dégradation du méthanesulfonate sont ensuite réduits en H₂S par une sulfite réductase CysI, comme nous l'avons vu dans la voie de biosynthèse de la cystéine par sulfhydrylation.

1.3.2.5 Synthèse du DMSP à partir de la L-méthionine et catabolisme

La L-méthionine constitue chez certains organismes le précurseur d'un composé au rôle métabolique important, le DMSP, qui est une molécule clef dans le cycle global du soufre. On le retrouve par exemple dans le phytoplancton marin, où il est utilisé comme composé dissuasif contre les prédateurs et comme antioxydant³²⁶. Le DMSP produit par ces organismes se retrouve dans l'atmosphère après transformation en DMS. Ces deux molécules soufrées jouent un rôle primordial dans le climat, le DMS jouant un rôle majeur dans la formation des nuages et potentiellement dans la régulation du climat (gaz à effet de serre). Le DMS peut être oxydé en sulfate, dioxyde de soufre ou méthane-thiol et autres molécules soufrées volatiles qui constituent les noyaux des nuages, jouant ainsi un rôle indirect sur l'ensoleillement. La dégradation du DMSP en DMS et les échanges de DMS qui en résultent à l'interface océans - atmosphère constituent la principale source naturelle de soufre dans l'atmosphère. Le flux de DMS de l'océan vers l'atmosphère est estimé à environ 1,5 x 10¹³ g de soufre par an³²⁷. Le DMSP et le DMS sont assimilés soit via la formation de méthane-thiol, soit via la production de DMS/DMSO pour aboutir à la formation de sulfites assimilables.

Comme nous l'avons évoqué, les voies d'assimilation du DMSP et du DMS empruntent les voies décrites précédemment pour le recyclage de la L-méthionine via le DMS. Notre bactérie modèle *Acinetobacter baylyi* ADP1 étant une bactérie du sol, nous avons abordé lors de mon travail de thèse sa capacité à assimiler ces deux molécules importantes (cf. résultats et discussion). Dans la partie qui suit, nous allons présenter d'une part les deux voies de formation du DMSP chez les organismes marins (surtout des algues et des plantes chez qui il sert d'osmolyte)³²⁸, et d'autre part les voies d'assimilation bactériennes de ces molécules.

➤ Synthèse de DMSP à partir de la L-méthionine

Aucune voie de biosynthèse du DMSP n'a été décrite chez les bactéries, bien que de nombreuses espèces bactériennes possèdent des enzymes capables de le dégrader. Les deux seules voies potentielles pour la synthèse du DMSP ont été décrites uniquement chez les Viridiplantae, plantes ou algues : l'une est assez bien connue et l'autre est hypothétique mais comprend un intermédiaire correspondant à un analogue de la méthionine, le 2-hydroxy-4-(méthylthio)butanoate (HMTB), qui pourrait être converti en DMSP en 2 étapes seulement (figure 66).

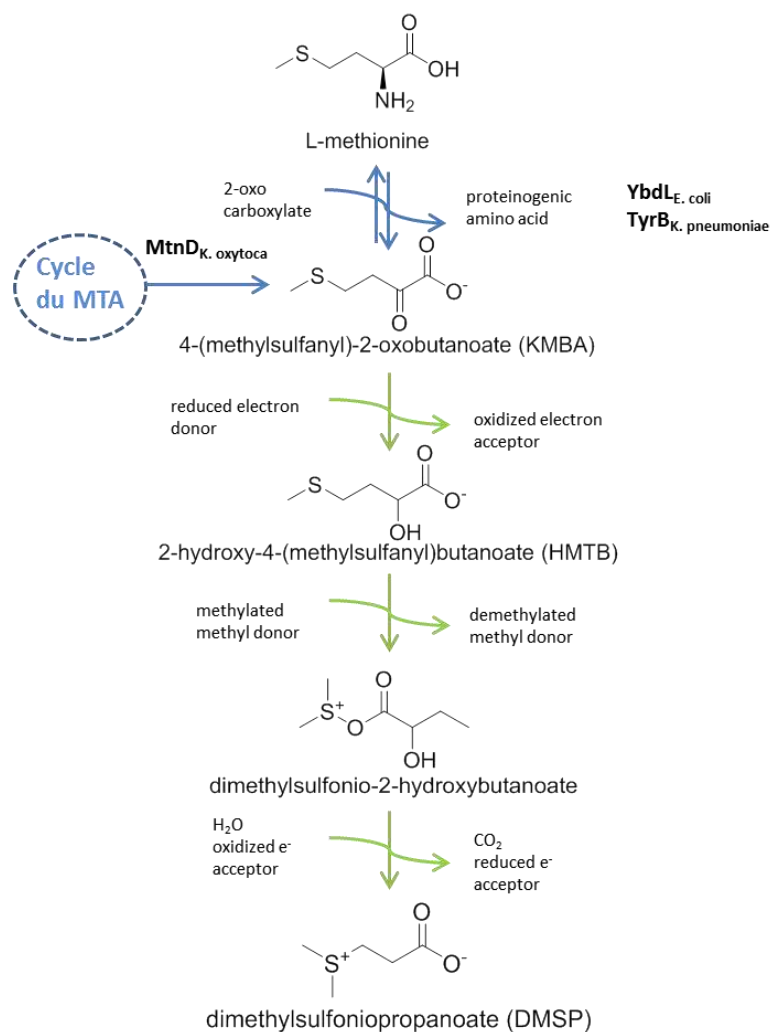


Figure 66 : Voie métabolique proposée pour la biosynthèse du DMSP chez l'algue marine *Enteromorpha intestinalis* et diverses autres algues. Les voies indiquées en bleu sont des voies retrouvées chez les bactéries dans le cycle du MTA décrit précédemment (modifié de Gage et al., 1997).

La voie la plus détaillée, démontrée notamment chez les plantes, débute par la méthylation de la L-méthionine en S-méthyl-L-méthionine par l'enzyme cytosolique L-méthionine S-méthyltransférase, et se poursuit par la conversion en 3-diméthylsulfoniopropionaldéhyde, précurseur du DMSP, via un couplage de réactions de transamination-décarboxylation³²⁹ (figure 67).

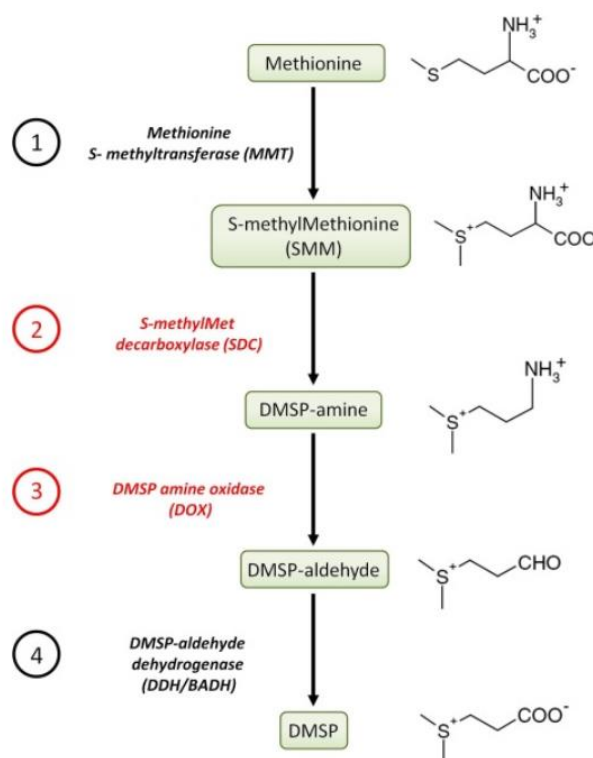


Figure 67 : Biosynthèse du DMSP à partir de la L-méthionine via la synthèse de diméthylsulfoniopropionaldéhyde (DMSP-aldéhyde) chez la plante *Spartina* (issu de Rousseau et al., 2017).

Il a été montré chez une Graminée, *Sporobolus alterniflorus*, que deux enzymes étaient spécifiquement responsables de ce couplage : une S-méthyl-L-méthionine décarboxylase (PLP dépendante) et une DMSP-amine oxydase. L'aldéhyde est ensuite transporté vers le chloroplaste où il est oxydé en DMSP par une déshydrogénase³³⁰. La probabilité de trouver l'une de ces trois dernières enzymes chez les bactéries semble extrêmement faible, bien qu'il soit néanmoins possible d'observer dans Uniprot une trentaine de protéines bactériennes prédites comme probables [SAM : L-méthionine-S-méthyltransférases], première enzyme de cette voie.

La seconde voie semble plus spécifique aux algues : les premières études réalisées dans les années 1960s avec la macro algue verte *Ulva lactuca* ont montré que la L-méthionine était la source de l'atome de soufre et des deux groupements méthyles du DMSP, et que le carbone α de la méthionine était aussi la source du groupe carboxylique³³¹. La voie de biosynthèse du DMSP chez l'algue *Ulva intestinalis* n'a cependant été confirmée que 30 ans plus tard, à l'aide d'un marquage isotopique *in vivo*³³². Les intermédiaires de la voie ont été trouvés chez plusieurs autres espèces, dont l'algue unicellulaire *Emiliania huxleyi*, la diatomée *Melosira nummuloides* et une espèce de *Tetraselmis*, un prasinophyte. Cependant, aucune des enzymes participant à cette voie n'a encore été caractérisée.

À noter que chez les champignons la L-méthionine est le précurseur du méthional (molécule soufrée très prisée en agro-alimentaire car donnant une saveur de chips de pomme de terre) via la

formation de KMBA grâce à deux méthionine aminotransférases (ARO8 et ARO9 chez *S. cerevisiae*). Après la transamination de la L-méthionine en KMBA, ce 2-oxo acide est converti en 3-méthylthiopropenal et finalement en méthionol, qui est excrété de la cellule. Chez *S. cerevisiae*, la décarboxylation se fait par la 2-oxo acide décarboxylase, codée par le gène ARO10. La dernière étape semble similaire à l'étape équivalente dans la dégradation d'autres acides aminés par la voie dite d'Ehrlich (figure 68) qui permet d'obtenir un alcool estérifiable à partir d'un acide aminé lors des processus de fermentation³³³.

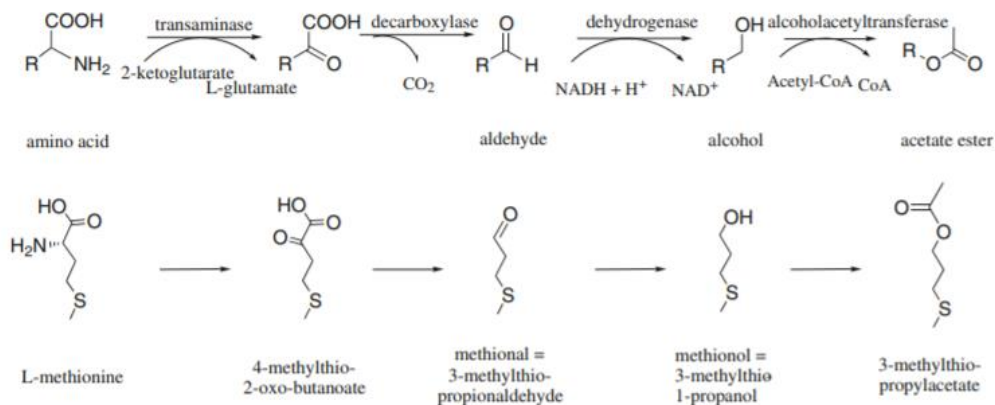


Figure 68 : Catabolisme des acides aminés par la voie d'Eirlich chez les levures aboutissant à la production d'alcool (issu de Etschmann et al., 2008).

Bien que la L-méthionine ne soit pas un acide aminé aromatique, de nombreuses similitudes sont visibles entre sa dégradation et la dégradation des acides aminés aromatiques chez *S. cerevisiae* impliquant les mêmes familles d'enzymes, à large spécificité de substrats³³⁴.

En résumé, la méthionine peut être utilisée par les Viridiplantae pour produire du DMSP afin d'assurer des fonctions physiologiques variées (rôle osmoprotecteur, cryoprotecteur, antioxydant, répulsif...), ou former divers composés volatiles soufrés (méthanethiol, DMS...) qui sont réutilisés par les plantes elles-mêmes ou alors excrétés et utilisés par les bactéries dans le métabolisme anabolique du soufre (figure 69).

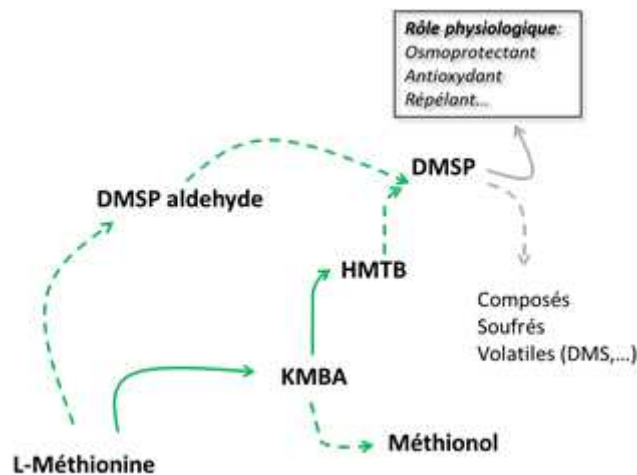


Figure 69 : Résumé des grandes voies de synthèse du DMSP à partir de la L-méthionine.

➤ Catabolisme du DMSP

La dégradation biologique du DMSP serait la principale source de sulfure de diméthyle (DMS) dans le monde marin¹⁹⁹. Kiene R.P. et Taylor B.F. ont en outre remarqué que le DMSP est aisément dégradé dans divers systèmes biologiques, y compris des cultures bactériennes, des sédiments de marais salants et des échantillons d'eau de mer contenant des algues ou du zooplancton²⁴¹. Si aucun procaryote à ce jour n'est connu à notre connaissance pour synthétiser le DMSP, un grand nombre d'entre eux, notamment chez les bactéries marines et les bactéries du sol, sont capables d'utiliser le DMSP produit par les autres organismes, révélant ainsi l'existence de voies cataboliques du DMSP (pour revue Reisch et al., 2011³³⁵). Le DMSP est relié métaboliquement au méthaneéthiol à travers deux grandes voies dont l'une ne produit pas d'autres molécules soufrées volatiles : l'une permet la biosynthèse de méthaneéthiol à partir de la dégradation du DMSP ; la seconde, pour laquelle il existe en réalité probablement deux variantes, passe par la synthèse de DMS (figure 70). Il est à noter que chez de nombreux organismes les voies impliquées dans l'assimilation de ces molécules soufrées étaient jusqu'à très récemment encore mal connues voire inconnues, comme c'est encore le cas pour la synthèse de DMSP où de nombreuses étapes sont encore orphelines de gènes.

- **Catabolisme du DMSP via le 3-(méthylsulfanyl)propanoate (MTPA)**

La voie permettant de former du méthaneéthiol à partir du DMSP sans passer par le DMS a été décrite en entier chez *Ruegeria pomeroyi* : il s'agit de la voie du 3-méthylsulfanyl- (ou 3-méthylthio-) propanoate (MTPA), analogue déméthylé du DMSP (figure 70). En 1992 une étude de populations bactériennes de la mer des Caraïbes a estimé que 5 à 66% du total des organismes dégradant le DMSP utilisaient la voie de déméthylation³³⁶. Des bactéries déméthylantes ont été isolées dans des environnements aérobies et anaérobies, et plusieurs d'entre elles effectuent également la réduction des sulfates. On suppose que ces bactéries utilisent le groupement méthyle éliminé du DMSP comme intrant dans la voie oxydative de l'acétyl-CoA/CO déshydrogénase (mais dans le sens de la production de CO₂, voie que l'on retrouve chez les bactéries homoacétogènes). En effet, lors de la seconde phase du processus de méthanisation appelée acétogénèse, l'oxydation des substrats (surtout les acides propionique et butyrique et également l'éthanol) est couplée à la formation d'hydrogène, de CO₂ et

d'acétate. L'acétogénèse est notamment réalisée par trois groupes de bactéries, dont les homoacétogènes et les sulfato-réductrices³³⁷.

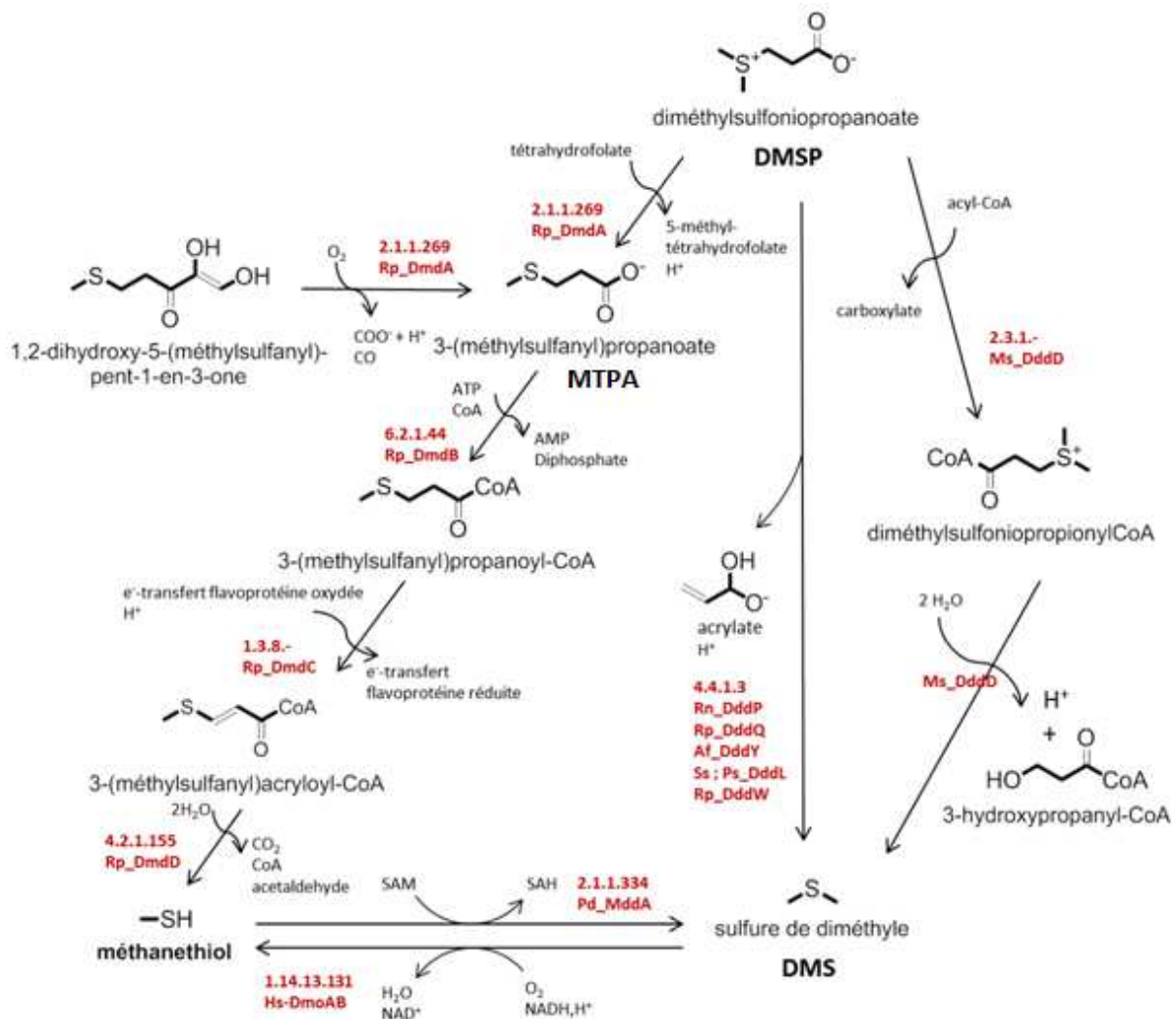


Figure 70 : Voies de conversion du DMSP et du méthanethiol en DMS. Af= *Alcaligenes faecalis* ; Hs= *Hyphomicrobium sulfonivorans* ; Ms= *Marinomonas sp* ; Pd= *Pseudomonas deceptionensis* ; Ps= *Pseudomonas sp* ; Rn= *Roseovarius nubinhibens* ; Rp= *Ruegeria pomeroyi* ; Ss= *Sulfitobacter sp*.

La déméthylation du DMSP en MTPA est catalysée par la DMSP déméthylase DmdA (Uniprot ID : Q5LS57 ; EC 2.1.1.269), dont le gène a donc été découvert chez la bactérie aérobie marine *R. pomeroyi*. Un gène homologue provenant d'une autre bactérie marine, *Candidatus Pelagibacter ubique* HTCC1062 (considérée comme la bactérie la plus abondante de la planète) a été cloné et exprimé dans *E. coli* : l'enzyme correspondante, DmdA_{ubique} (Uniprot ID : Q4FP21), lui a alors permis de convertir le DMSP en MTPA. L'analyse de séquences d'échantillons environnementaux suggère qu'environ un tiers des bactéries des eaux de surface océaniques possèdent des gènes similaires au gène *dmdA*, et peuvent participer à la déméthylation du DMSP³²⁶. Les protéines de *R. pomeroyi* et *P. ubique* ont été purifiées et étudiées. Ces enzymes se sont révélées avoir un Km élevé pour le DMSP (> 5 mM) : cela peut s'expliquer par le fait que les bactéries peuvent accumuler le DMSP intracellulairement à des concentrations élevées, jusqu'à 70 mM³³⁸. Dans certains organismes, tels que *Desulfobacterium sp.* PM4, le MTPA est le produit final d'une impasse métabolique³³⁹, comme nous l'avons évoqué précédemment pour *K. oxytoca* dans le cycle du MTA. Dans d'autres, il est réutilisé et

peut être traité de deux manières : soit par transformation et clivage en méthane-thiol et acétaldéhyde, soit par déméthylation supplémentaire conduisant au 3-sulfanylpropanoate ou 3-mercaptopyruvate (TPA), qui est l'analogue déaminé de la L-cystéine (le TPA peut alors être utilisé par certaines bactéries pour produire indirectement des sulfites). Dans les milieux anaérobies, le MTPA est également utilisé comme substrat pour les bactéries méthanogènes (méthanogenèse du MTPA).

La voie de dégradation par clivage du MTPA telle qu'elle est décrite chez *R. pomeroyi* DSS-3 présente trois étapes (figure 70). Les trois enzymes de ces étapes, reliées au métabolisme de β -oxydation des acides gras, catalysent successivement l'activation du MTPA en 3-(méthylsulfanyl)propanoyl-CoA, la réduction de ce dernier en 3-(méthylsulfanyl)acryloyl-CoA, et enfin l'hydrolyse décarboxylante en méthane-thiol, acétaldéhyde et CO_2 ³³⁵. Le clivage du MTPA entraînant la production de méthane-thiol est connu depuis longtemps, et rapporté dans plusieurs organismes incluant des bactéries non identifiées (dont DG-C1²⁴⁰ en 1991), et *Alteromonas macleodii*³⁴⁰ (en 1993). Néanmoins, les détails de la voie restaient jusque là mal compris, et les enzymes impliquées n'ont été caractérisées dans aucun de ces organismes. En 1999, une étude de Gonzalez et al. a permis de mettre en lumière 5 souches marines capables de dégrader le DMSP de deux manières, à la fois par déméthylation en MTPA suivie d'un clivage en méthane-thiol et en acrylate (selon l'hypothèse des auteurs), et par clivage direct du DMSP pour former de l'acrylate et du DMS³⁴¹. Il a ensuite été montré que le DMSP et le méthane-thiol étaient utilisés par ces bactéries comme sources de soufre pour la biosynthèse de méthionine et de protéines soufrées³⁴². Une hypothèse suggérait que le MTPA était catabolisé dans un mécanisme similaire à la β -oxydation des acides gras. Mais la voie réelle a été découverte en 2011 grâce à l'analyse des intermédiaires réactionnels contenant du CoA produits par *R. pomeroyi* DSS-3, qui a ainsi révélé la présence de 3-(méthylsulfanyl) propanoyl-CoA. L'enzyme produisant ce composé a été isolée, et le gène *dmdB* a été identifié (DmdB ; Uniprot ID : Q5LRT0). Il a ensuite été montré que le 3-(méthylsulfanyl) propanoyl-CoA était converti en 3-(méthylsulfanyl) acryloyl-CoA sur extraits cellulaires bruts, et que ce dernier était converti en méthane-thiol et en CoA libre. L'enzyme catalysant la libération de méthane-thiol a été purifiée et le gène *dmdD* a été identifié. Il a aussi été établi que le gène *dmdC*, situé à côté de *dmdD*, code pour l'enzyme responsable de la réduction du 3-(méthylsulfanyl) propanoyl-CoA en 3-(méthylsulfanyl) acryloyl-CoA. Enfin, lors de la purification de DmdD (Uniprot ID : Q5LLW6), il a été montré que la réaction produit non seulement du méthane-thiol mais également de l'acétaldéhyde et du CO_2 ³³⁵ et non de l'acrylate comme cela avait été suggéré par Gonzalez et al. L'analyse des données de métagénomique marine indique que cette voie de dégradation du DMSP via le clivage du MTPA est très répandue parmi le bactérioplancton présent dans les eaux de surface des océans, ce qui en fait l'une des voies les plus connues pour l'acquisition de carbone et de soufre réduits par les hétérotrophes de surface³³⁵.

- **Catabolisme du DMSP via la formation directe de DMS par des DMSP lyases**

La voie « traditionnelle » de clivage direct du DMSP en DMS et en acrylate a été décrite dès 1962³⁴³. Depuis, elle a été décrite aussi bien chez des bactéries aérobies qu'anaérobies, chez un dinoflagellé hétérotrophe, et chez des algues et des champignons marins³⁴⁴. Dans cette voie, différentes DMSP lyases (EC 4.4.1.3) clivent directement le DMSP en DMS et acrylate (figure 70).

Cette enzyme a initialement été décrite à partir de l'algue rouge *Vertebrata (=Polysiphonia) lanosa*, puis purifiée à partir de plusieurs autres organismes, dont la bactérie microaéroophile *Alcaligenes faecalis* M3A³⁴⁵ et la bactérie anaérobie *Halodesulfovibrio aestuarii* DSM 10141³⁴⁶. Cependant le premier gène codant pour une telle enzyme (DddL) n'a été trouvé qu'en 2008, chez la bactérie marine *Sulfitobacter* sp. EE-36³⁴⁷ (DddL_{sulfitobacter} ; Uniprot ID : A3SC37). Lorsque le gène *dddL* a été cloné et exprimé dans une souche d'*E. coli*, il a conféré à son hôte une capacité élevée de production de DMS à partir du DMSP. Des homologues de DddL ont été trouvés dans les bactéries marines *Sulfitobacter* sp., *Loktanella vestfoldensis*, *Labrenzia agrégata*, *Dinoroseobacter shibae*, *Pseudoceanicola batsensis*, *Maritimibacter alkaliphilus* et *Fulvimarina pelagi*, ainsi que dans deux souches de *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 et ATCC 17029³⁴⁷. La source de ces deux dernières souches n'est pas connue, mais elles pourraient aussi être marines. Curieusement, plusieurs gènes supplémentaires, *dddP*, *dddQ* et *dddY*, ont été trouvés comme codant des enzymes non apparentées mais possédant la même activité³⁴⁸. Les gènes *dddP* ont été trouvés dans de nombreuses α -protéobactéries marines (ils sont plus abondants que les gènes *dddL* dans l'ensemble des données d'échantillonnage « Global Ocean »), certaines γ -protéobactéries, ainsi que certains champignons³⁴⁹ et des phages marins, tandis que *dddQ* semble être limité au clade *Roseobacter*, et *dddY* limité à plusieurs genres microaérophiles. La diversité remarquable de ces enzymes suggère qu'elles ont évolué dans des environnements différents, pour répondre à des conditions et des besoins différents, et met en évidence l'importance du DMSP dans l'environnement marin.

Certaines bactéries possèdent plusieurs types de voies en parallèle pour dégrader le DMSP et plusieurs DMSP lyases. *R. pomeroyi* possède en plus du cluster de gènes *dmdABCD* de la voie de déméthylation, deux DMSP lyases (*DddP*, *DddQ*). Une troisième lyase, *DddW*, a été identifiée par Todd et al. . *DddW* est une enzyme de taille modeste (16,9 kDa) qui contient un domaine C-terminal de cupine. Brummett et al. l'ont purifiée et ont noté que *DddW* (Uniprot ID : Q5LW89) est une métalloenzyme, comme les DMSP lyases *DddQ* et *DddP*, et contient du fer comme cofacteur essentiel à son activité³⁵¹. Bien d'autres bactéries sont capables de produire concomitamment du méthane-thiol et du DMS lors de la dégradation du DMSP. C'est notamment le cas de *P. ubiqua* HTCC1062, qui possède la DMSP lyase cupine-like *DddK* en plus des enzymes codées par les gènes *dmdABC* ; à noter cependant l'absence curieuse du gène *dmdD*, qui n'empêche pas pour autant la production de méthane-thiol à partir de la voie de déméthylation du DMSP, laissant suggérer la présence d'une enzyme analogue complétant ce schéma métabolique³⁵².

En résumé, il existe actuellement 7 DMSP lyases distinctes chez les protéobactéries et quelques ascomycètes, annotées *Ddd* (pour « DMSP dependence DMS releasing »). En outre, toutes ces métalloenzymes présentent des niveaux d'activité variables. De plus, alors que *DddD* (CoA-transférase-lyase de classe III) et *DddP* (famille des M24B métallopeptidases) appartiennent vraisemblablement à des familles de protéines différentes, les autres lyases *DddL*, *DddQ*, *DddW*, *DddK* et *DddY* (protéine périplasmique) appartiennent toutes à une superfamille d'enzymes à motif cupine^{353,354}, nommée cupin-DLL (pour « cupin DMSP lyase and lyase-like »). Enfin une analyse phylogénétique a montré que les familles connues de DMSP lyases sont sporadiquement distribuées, suggérant que ces lyases ont évolué plusieurs fois dans cette superfamille. Cependant, l'activité spécifique DMSP lyase inhabituellement faible de certaines enzymes et l'analyse de leur contexte génomique laissent penser que cette activité DMSP lyase n'est pas la fonction native de la plupart des familles cupin-DLL. En effet, un profilage systématique de la sélectivité de substrats avec un panel de composés analogues au DMSP a permis d'indiquer que certains membres, dont notamment *DddY* et

DddL, sont d'authentiques DMSP lyases, tandis que d'autres, en premier lieu DddQ, peuvent seulement présenter une activité DMSP lyase promiscuitaire³⁵⁴. Finalement, un bon nombre d'enzymes de cette superfamille cupin-DLL restent sans fonction connue.

- **Catabolisme du DMSP en DMS via le diméthylsulfoniopropioyl-CoA**

Il existe cependant une seconde voie de clivage du DMSP, catalysée par la DMSP: acyl-CoA transférase-lyase (EC 2.3.1) codée par le gène *dddD*. Cette autre enzyme, qui dégrade le DMSP en DMS, a été identifiée à partir de la γ -protéobactérie marine *Marinomonas sp.* MWYL1³⁵⁵. Le gène *dddD* code donc pour une CoA transférase de classe III qui active le DMSP en un dérivé de CoA avant son clivage. La transcription de ce gène est contrôlée par un facteur de transcription dédié (Uniprot ID : A6W2L2), codé par le gène *dddR*. Todd et al. ont proposé en 2007 que le thioester diméthylsulfoniopropioyl-CoA puisse être catabolisé par une ou plusieurs étapes en DMS et 3-hydroxypropanoate (3HP), afin d'expliquer les observations selon lesquelles certaines bactéries qui dégradent le DMSP en DMS accumulent du 3HP plutôt que de produire de l'acrylate³⁵⁶. Mais en 2014, Alcolombri et al. ont démontré que DddD (Uniprot ID : A6W2K8) était une enzyme bifonctionnelle également capable de produire du DMS, de l'acétate et du 3HP-CoA, ce dernier étant pris en charge par la réductase DddA (relargant du CO₂) et la déshydrogénase DddC capable de régénérer de l'acétylCoA et d'initier un nouveau cycle de dégradation du DMSP³⁵⁷. Des homologues du gène *dddD* ont été trouvés dans plusieurs autres bactéries marines, ainsi que dans les bactéries associées aux plantes *Burkholderia ambifaria* et *Sinorhizobium fredii*, chez qui la production de DMS lors du catabolisme du DMSP a été confirmée³⁵⁵.

En conclusion, le DMSP peut être assimilé par les bactéries via la formation du DMS ou du méthane-thiol, qui sont alors tous les deux transformés en H₂S par les voies déjà décrites dans la voie de recyclage de la L-méthionine. À noter que chez *Hyphomicrobium sulfonivorans*, la réaction inverse de déméthylation du DMS a été démontrée comme étant la première étape de l'assimilation du DMS atmosphérique. L'enzyme responsable de cette activité, la DMS monooxygénase (EC 1.14.13.131), a été pour la première fois caractérisée en 2011 par Boden et al. Cette enzyme appartient à la sous-famille des monooxygénases (MOx) à flavine, de la famille des luciférase, et est en outre étroitement liée aux nitrilotriacétate MOx. Elle est composée de deux sous-unités, DmoA (Uniprot ID : E9JFX9), une MOx FMNH₂-dépendante de 53-kDa, et DmoB, une oxydoréductase à flavine NAD(P)H-dépendante de 19-kDa dont le gène n'a pu être identifié³⁵⁸. L'enzyme purifiée a présenté un Km de 17,2 μ M pour le DMS, dont l'oxydation génère du méthane-thiol et du formaldéhyde. Aucune activité avec les substrats des enzymes apparentées n'a cependant été détectée, y compris les alcanesulfonates, les aldéhydes, le nitrilotriacétate ou le dibenzothiophènesulfone. La DMS-MOx représente ainsi une nouvelle classe de monooxygénases dépendantes du FMNH₂, basée sur sa spécificité pour le DMS et sur la phylogénie moléculaire reposant sur les prédictions issues de sa séquence protéique. À noter que le gène codant pour DmoA est co-localisé avec des gènes codant pour de putatives réductases à flavine, des homologues d'enzymes du métabolisme du soufre inorganique et organique, et d'enzymes impliquées dans la synthèse de la riboflavine³⁵⁸.

Pour finir et en résumé, la figure 71 synthétise les différentes voies inventoriées d'assimilation du DMSP ou DMS atmosphérique et les voies communes à celles du recyclage de la méthionine. À notre connaissance, aucun organisme n'a une voie complètement élucidée avec des enzymes caractérisées depuis la dégradation du DMSP jusqu'à la formation de H₂S.

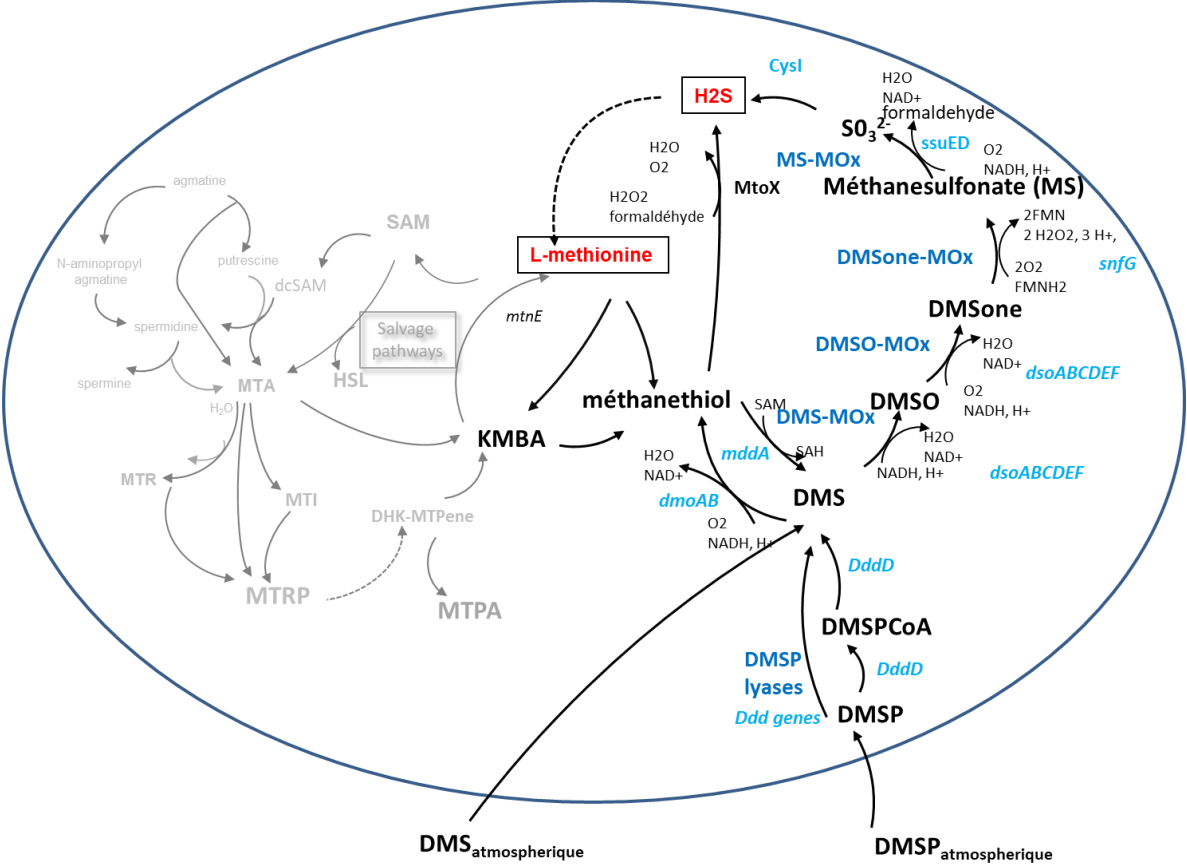


Figure 71 : Inventaire des voies d'assimilation du DMSP et du DMS atmosphérique chez les bactéries.

1.4 *A. baylyi* ADP1, bactérie modèle

Acinetobacter baylyi ADP1 a été choisie au Genoscope au début des années 2000 comme bactérie modèle complémentaire à ceux existants pour l'étude du métabolisme, en raison de son large spectre de substrats et de sa tendance naturelle à intégrer et incorporer l'ADN étranger dans son génome, lui conférant un atout naturel à sa manipulation génétique³⁵⁹⁻³⁶¹. Le genre *Acinetobacter*, de l'ordre des *Pseudomonadales*, appartient à la classe des γ -protéobactéries et regroupe près de 60 espèces (<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>). Les espèces de ce genre sont Gram négatives, parfois pathogènes (souches d'*Acinetobacter baumannii*) dont certaines dites multirésistantes³⁶² et aux métabolismes divers qui sont le reflet des nombreux écosystèmes colonisés par ces bactéries³⁶³. La souche ADP1 est un coccobacille du sol, non pathogène et aérobie stricte qui croît à température d'incubation entre 30°C et 37°C. ADP1 a été séquencée au Genoscope, et elle fut le premier génome publié du genre *Acinetobacter*. Le génome a été annoté au Genoscope/UMR8030 par une équipe d'annotateurs du LabGeM qui a apporté un soin particulier aux gènes codant pour les enzymes impliqués dans le métabolisme³⁶⁴. Aujourd'hui, il y a plus de 2500 projets de séquençage de souches d'*Acinetobacter* répertoriés dans la base de données GOLD dont plus de 150 génomes complètement séquencés et publiés, majoritairement les souches pathogènes opportunistes responsables de maladies nosocomiales. Les autres espèces non pathogènes³⁶⁵ sont cependant de plus en plus étudiées pour leurs applications environnementales ou en biotechnologies^{360,366,367} du fait de leur capacité à dégrader un certain nombre de polluants (biphényles, biphényles chlorés, benzoate, etc.) ou pour produire différentes molécules (indigo, cyanophycin, bioémulsifiants, esters d'acides gras, D-xylulose, alcanes, tensioactifs, etc)³⁶⁸⁻³⁷⁴.

ADP1 a donc deux propriétés extrêmement utiles pour des manipulations génétiques, propriétés qu'elle partage avec *B. subtilis* : elle est naturellement compétente (capacité d'une bactérie à intégrer une molécule d'ADN libre dans son environnement³⁵⁹⁻³⁶¹) et elle fait spontanément la recombinaison homologue (capacité d'échanger et donc d'intégrer dans son génome, des molécules d'ADN identiques ou similaires). Il est donc très facile de muter, éliminer ou ajouter un gène pour faire des études de perturbations génétiques et réaliser des délétions multiples³⁷⁵. De plus, ADP1 a un génome de 3,7 Mbases avec peu de gènes comparé à *E. coli* ou *B. subtilis* (~3200 gènes chez ADP1 versus plus de 4000 chez *B. subtilis* et *E. coli*) et il y a peu de redondance de fonction (Barbe et al., 2004). Ceci présente l'avantage que le phénotype, suite à la délétion d'un gène, est moins fréquemment masqué par un paralogue iso-fonctionnel. Malgré un génome relativement compact (c.-à-d. de taille 60 % inférieure aux *Pseudomonas*), ADP1 possède des capacités métaboliques importantes grâce notamment à un « archipel » d'îlots génomiques dédié au catabolisme d'une grande variété de composés organiques produits par le métabolisme secondaire des plantes (ferulate, quinate, cafféate ... - figure 72).

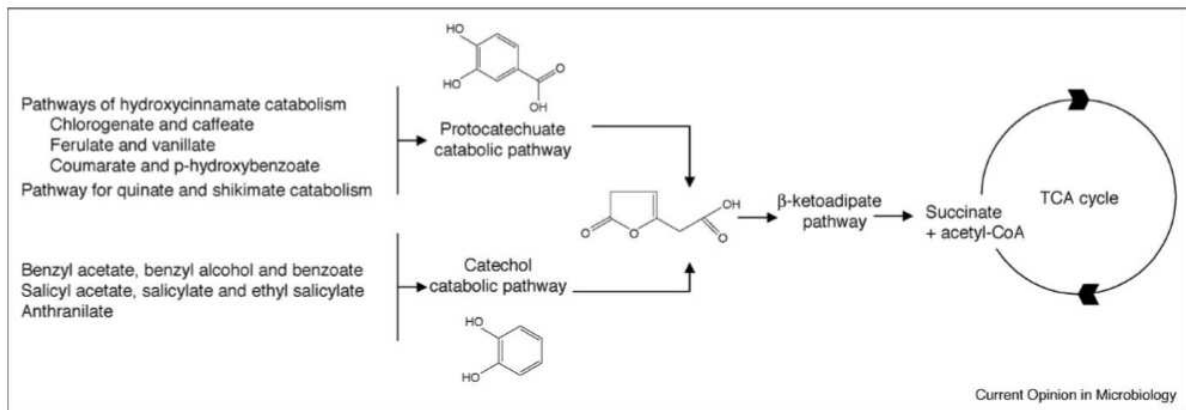


Figure 72 : Dégradation des composés aromatiques par la voie du β -cétoadipate chez ADP1 organisé en « archipel métabolique » (issu de de Berardinis et al., 2009).

Les qualités qu'offre ADP1 pour sa manipulation génétique, ainsi que son métabolisme plus simple car uniquement aérobie mais riche car ADP1 est capable de croître sur un très grand panel de substrats, en faisant un modèle alternatif idéal pour le laboratoire et complémentaire aux modèles que représentaient *E. coli* ou *B. subtilis*³⁶⁸.

1.4.1 Des ressources génomiques et des outils pour l'étude du métabolisme d'ADP1

Il a donc été décidé de créer au laboratoire deux ressources pour réaliser des études systématiques et à grande échelle du métabolisme. Premièrement, une collection complète de mutants de délétion (remplacement intégral du gène par une cassette de résistance à la kanamycine) a été réalisée sur un milieu synthétique minimal avec du succinate comme source de carbone et sulfate comme source de soufre aboutissant à l'obtention de 2594 mutants de délétions (82% des gènes d'ADP1) dont environ 1000 concernent des gènes de fonction inconnue (de Berardinis et al., 2008⁷³). Deuxièmement, tirant profit de la plateforme de clonage et de criblage du laboratoire LCAB, l'ORFéome d'ADP1 a été obtenu : 2400 gènes non membranaires ont été clonés dans un vecteur d'expression modifié de type pET22 avec une étiquette six histidines en N-ter. Ces ressources ainsi que différentes approches (phénotypage complet de la collection de mutants, études métabolomiques, transcriptomiques, enzymologiques, ...) sont utilisées au laboratoire pour différentes études³⁷⁶⁻³⁷⁸ dont celle du soufre qui avait été initiée sur la biosynthèse de la L-méthionine (figure 73).

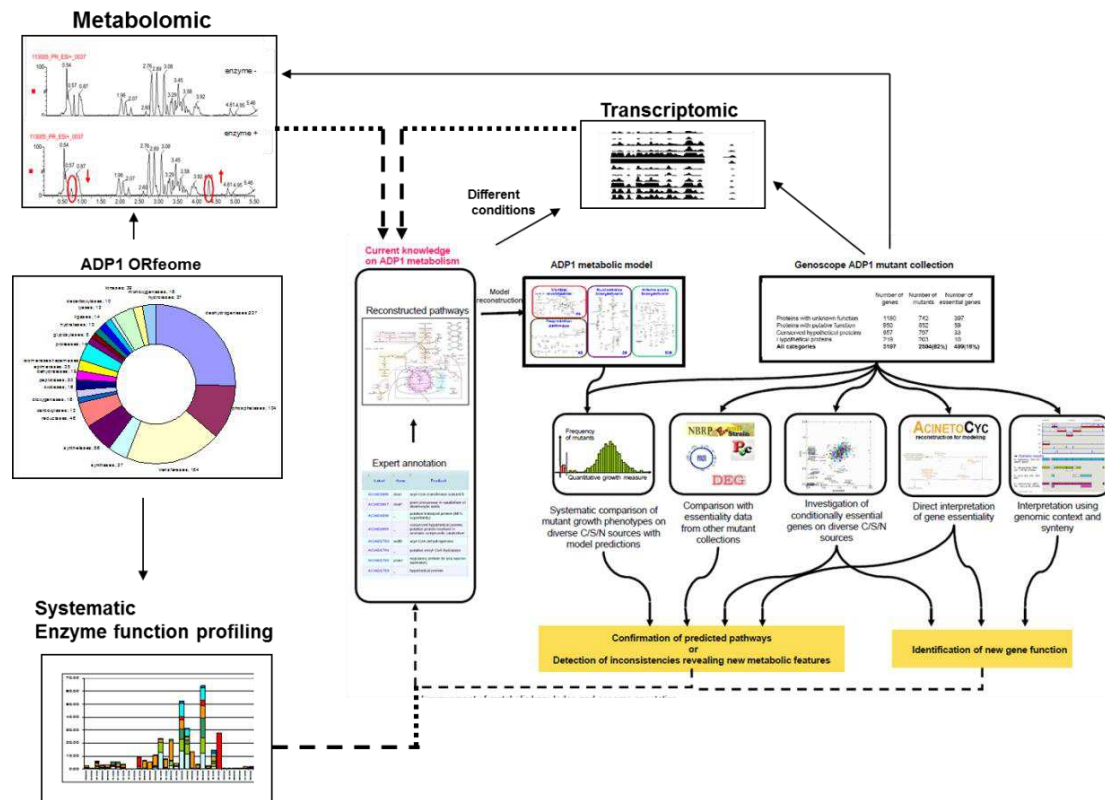


Figure 73 : Exploration du métabolisme d'ADP1 au laboratoire (issu de de Berardinis et al., 2009).

1.4.2 Biosynthèse de la méthionine chez ADP1

L'annotation du génome d'ADP1 avait prédit que la biosynthèse de la L-méthionine à partir de la L-homosérine était similaire à celle décrite chez les espèces *Pseudomonas syringae*⁷¹ et *Pseudomonas putida*¹³⁷. La première étape d'acylation est catalysée par MetX (ACIAD0529) qui en 2004 était prédite comme étant une O-acétyl-L-homosérine transférase (MetX-HAT), comme la MetX d'*Haemophilus influenzae*³⁷⁹ et les *Pseudomonas* mentionnées précédemment. Le projet a commencé au laboratoire avec l'étude de cette enzyme qui, en réalité et comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, s'est révélée être une O-succinyl-L-homosérine transférase (MetX-HST), comme MetA_{coli}. Comme cela a été mentionné dans le paragraphe 1.2.1, une étude à large échelle de ces deux familles d'enzymes a permis d'identifier les résidus discriminants pour l'utilisation de l'acyl-CoA et démontré que c'est la présence d'une arginine dans le site actif qui attire le succinyl-coA et permet son utilisation (Bastard et al., 2017⁶²) - figure 74.

O-acetyl-L-homoserine transferase
codée par *metX* d'*Haemophilus influenzae*

O-succinyl-L-homoserine transferase
codée par *metX* d'ADP1

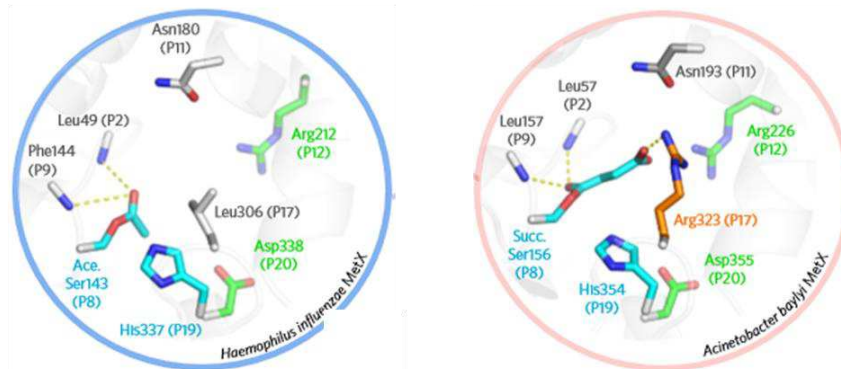


Figure 74 : La présence d'un résidu chargé (arginine) est déterminante pour l'usage du succinyl-CoA chez MetX-HST_{ADP1} comparé à MetX-HAT_{influenzae} (modifié de Bastard et al., 2017).

Ces résultats corroboraient les résultats préliminaires qui montraient que le gène *metA* d'*E. coli* complète un mutant $\Delta metX_{ADP1}$ auxotrophe à la méthionine et vice versa⁷³. Au laboratoire, il a été montré qu'un mutant MetX R323L induit un changement total de préférence du succinyl-CoA vers l'acétyl-CoA, le résultat inverse ayant été obtenu avec un mutant MetX L306R d'*H. influenzae*⁶². Au final, cette découverte a montré *de facto* que *Pseudomonas aeruginosa* qui était jusqu'alors considéré comme une exception chez les Pseudomonadales (comparé à *Pseudomonas syringae*⁷¹ ou *Pseudomonas putida*¹³⁷), était en réalité le premier représentant de MetX décrit avec une activité HST⁷⁰. Le gène *metX* est co-transcrit chez *Pseudomonas syringae* avec le gène *metW*⁷¹ codant pour une protéine de fonction inconnue, gène dont le mutant $\Delta ACIAD0528$ est essentiel chez ADP1⁷³. Il a été montré au laboratoire que la surexpression de *metX*_{ADP1} seul permet de lever l'auxotrophie à la méthionine d'un mutant $\Delta metW_{ADP1}$, suggérant pour ce petit gène un rôle de chaperon⁷³. Renforçant cette hypothèse, il a été montré que la co-expression de *metXW* était souvent nécessaire à l'activité *in vitro* de la MetX purifiée, et ce chez de nombreuses γ -protéobactéries alors qu'il ne l'est pas chez les β -protéobactéries *Neisseria gonorrhoeae* ou *Burkholderia thailandensis* par exemple⁶².

Selon l'annotation, l'O-succinyl-L-homoserine serait transformée en L-homocystéine soit par la voie de sulfhydrylation directe, deux gènes *metY* et *metZ* codant pour une O-acyl-L-homoserine sulfhydrylases (MetY_{ADP1} : ACIAD3382 et MetZ_{ADP1} : ACIAD2314) ayant été identifiés dans le génome, soit par la voie de transsulfuration via la CTT- γ -synthase, catalysée par MetZ et par une CTT- β -lyase ou CBL qu'est MetC (ACIAD3222). De ces trois gènes, seul le mutant $\Delta metZ$ est essentiel dans les conditions d'obtention de la collection de mutants en présence de sulfate. Ce mutant est capable de croître de manière similaire en présence de méthionine ou de cystathionine, suggérant que la voie de transsulfuration serait utilisée chez ADP1 (contrairement à ce qui est observé chez *P. aeruginosa* où MetZ est très majoritairement impliquée dans la sulfhydrylation directe⁷⁰). Dans ces conditions, la voie de sulfhydrylation directe ne semble pas active chez ADP1 : ainsi la voie de transsulfuration serait catalysée par la CGS MetZ, et l'activité CBL serait catalysée par au moins deux isoenzymes, dont MetC (figure 75).

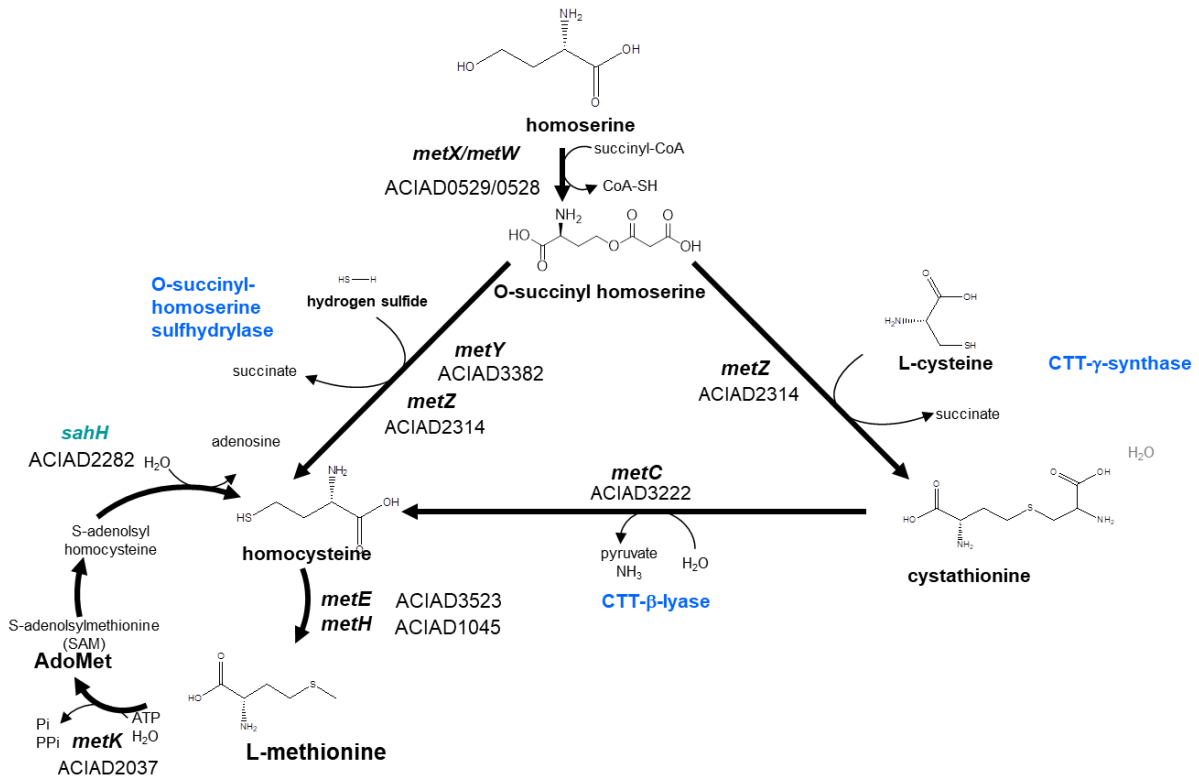


Figure 75 : Biosynthèse de la L-méthionine chez *Acinetobacter baylyi* ADP1 selon l'annotation.

L'activité *in vitro* de la CTT-γ-synthase et la CTT-β-lyase des enzymes MetZ_{ADP1} et MetC_{ADP1} ont été vérifiées au laboratoire et ces deux enzymes ont été utilisées dans le cadre d'un test couplé générique dans l'étude systématique de l'usage du succinyl-CoA sur une centaine de protéines (Bastard & Perret et al., 2017⁶²) en utilisant la production du pyruvate par MetC avec le suivi de la consommation de NADH en spectrophotométrie UV grâce à une lactate déshydrogénase.

Ensuite, l'homocystéine est transformée en L-méthionine par une méthionine synthase. Chez ADP1, il y a deux gènes codant pour des méthionine synthases, *metE* et *methH*, mais seul le mutant $\Delta metE$ est auxotrophe à la méthionine. Cela n'est pas surprenant car MetH (ACIAD1045) dont l'activité dépend de la vitamine B12, ne peut pas compenser l'absence de MetE chez ADP1 car la voie de biosynthèse de la vitamine B12 y est absente (comme chez *E. coli*³⁸⁰). Une analyse via la plateforme MicroScope montre cependant que MetE_{K12} est similaire à 62 % à MetE de *P. aeruginosa*, mais pas du tout à ADP1 et *P. putida* par exemple. Les deux méthionine synthases catalysent le transfert de méthyle depuis le 5-méthyltétrahydrofolate vers l'homocystéine. Le 5,10-méthylènetétrahydrofolate est ensuite réduit par une 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MetF, ACIAD2283).

Chez *E. coli*, *metE* est co-localisé avec le gène codant pour le régulateur MetR (de type LysR) qui régule la voie de biosynthèse de la méthionine avec comme effecteur l'homosérine comme nous l'avons vu. Chez ADP1, *metE* est en fait co-localisé avec un gène de fonction inconnue (ACIAD3524) dont le mutant $\Delta ACIAD3524$ est également auxotrophe à la méthionine. Ce gène de fonction inconnue est également conservé en synténie chez *P. putida* (PP_2699) mais pas *P. aeruginosa*. Le régulateur MetR (ACIAD2384) est codé par un gène isolé. La méthionine nourrit le cycle AdoMet, par le biais de

la S-adenosylméthionine synthase MetK (ACIAD2037 ; 74 % d'identité avec MetK_{coli}), permettant la synthèse de la SAM qui va jouer son rôle de transfert de méthyle, entre autres. Chez ADP1, on retrouve la voie SahH à une seule étape, retrouvée chez *Mycobacterium tuberculosis*¹⁹⁷ et *P. aeruginosa*¹⁹⁸ catalysée par la S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase (SahH, ACIAD2282), qui permet l'hydrolyse du SAH. Cette étape complète le cycle AdoMet en régénérant de la L-homocystéine ainsi que de l'adénosine. Chez ADP1, le gène *sahH* est co-localisé avec *metF*. À noter que le régulateur de transcription trouvé chez *E. coli*, MetJ, qui régule notamment *metK*, n'a pas d'homologue chez ADP1 ni chez nos *Pseudomonas* de référence.

Chez ADP1, les gènes impliqués dans la biosynthèse des polyamines (spermidines et spermines) qui initie le cycle du méthylthioadénosine (MTA) chez *E. coli* ou *B. subtilis* n'ont pas été trouvés dans son génome. Ces polyamines sont synthétisées comme nous l'avons évoqué à partir de la décarboxylation de la SAM grâce à une S-adenosyl méthionine décarboxylase, mais aucun homologue avec SpeD d'*E. coli* (Uniprot ID : P0A7F6) ou *SpeH* de *B. subtilis* (Uniprot ID : O34426) n'a été retrouvé dans le génome d'ADP1. De même, la deuxième enzyme de la voie, la spermidine synthase SpeE_{coli} (Uniprot ID : P09158) n'a pas d'homologue.

Les polyamines, qui jouent comme nous l'avons évoqué de nombreuses fonctions dans la cellule, représentent aussi souvent des molécules plateformes qui peuvent être fonctionnalisées. C'est pourquoi elles sont souvent incorporées dans des métabolismes spécialisés³⁸¹. Les membres du genre *Acinetobacter* produisent en grandes quantités une diamine, le 1,3 diaminopropane, par l'action successive de l'aspartate semialdéhyde-glutamate transaminase et de la 2,4-diaminobutyrate décarboxylase, à partir de l'aspartate-semialdéhyde. Les gènes codant pour ces deux enzymes sont présents chez ADP1 (ACIAD1210 et ACIAD1211) et ont été montrés comme essentiels à la formation de biofilms associés aux surfaces³⁸² et participant à la synthèse d'une des formes de sidérophore (Fimsbactin D) de la famille des Fimsbactins identifiées chez ADP1³⁸³. Cependant, la majorité des types de Fimsbactins identifiés contiennent un dérivé de la putrescine (figure 76), autre polyamine, sans doute issue de la décarboxylation de l'ornithine par l'action de l'ornithine décarboxylase (FbsJ ; ACIAD2768), comme chez *E. coli* présente dans le cluster *fb*s de synthèse de cette famille de sidérophores.

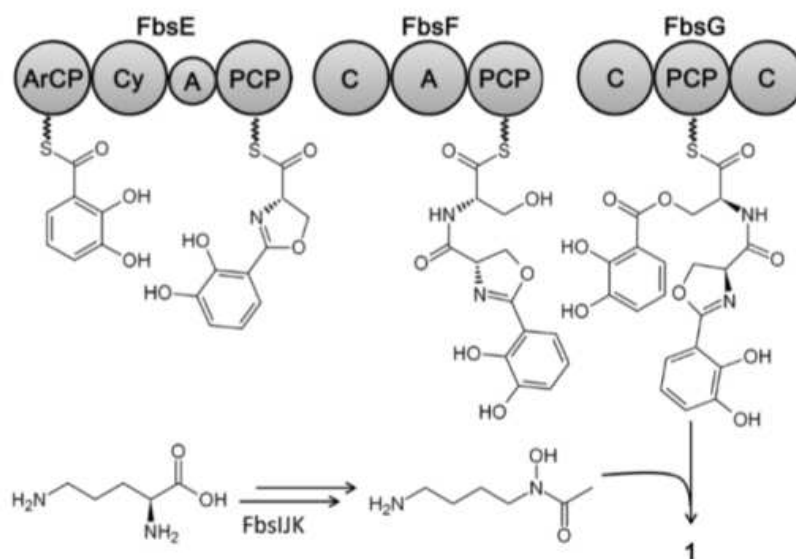


Figure 76 : Biosynthèse de la Fimsbactin A chez ADP1. FbsJ est l'ornithine décarboxylase (issu de Proschak et al., 2013).

Chez *Acinetobacter tartarogenes* ATCC 31105, l'homospermidine a été quantifiée comme étant une polyamine abondante et une homospermidine synthase (HPS), qui a pour substrat la putrescine, a été caractérisée et partiellement séquencée³⁸⁴. Une recherche via la plateforme MicroScope/MaGe dans le génome d'ADP1 en utilisant la séquence N-terminale (publiée par Yamamoto en 1993) n'a abouti à aucun résultat dans le génome d'ADP1. Cependant la même recherche menée via Uniprot pour rechercher la séquence de la protéine complète identifie bien à 100 % une homospermidine synthase (Uniprot ID : A0A1E4BTK5), mais de *Kaistia sp.*, une α -protéobactérie, mettant en doute la présence de ce gène chez *A. tartarogenes* ou même de cette polyamine chez *A. tartarogenes* car aucune publication depuis ne reprend ce résultat. En utilisant des HPS décrites dans la littérature³⁸⁵, une HPS a été trouvée via MicroScope dans le génome de *P. aeruginosa* PA14 mais pas chez *P. aeruginosa* PA01, ni *P. putida* KT2240 ni ADP1.

Concernant les voies de recyclage de la L-méthionine, aucune voie n'est prédite par l'annotation chez ADP1 car ni les gènes impliqués dans une voie de transsulfuration réverse, ni les gènes *mtn* impliqués dans le cycle du MTA, ni celui d'une méthionine- γ -lyase comme identifié chez *P. putida* n'ont été prédits lors de l'annotation d'ADP1. C'est pourquoi, jusqu'à mon sujet de thèse, la L-méthionine n'avait jamais été testée comme source de soufre, et qu'aucune recherche de voies de recyclages alternatives n'avait été menée. L'expérience a montré qu'en réalité cet acide aminé soufré était une excellente source de soufre pour ADP1, constituant le point de départ de mon travail exploratoire et de débroussaillage de ce métabolisme jusqu'alors non suspecté chez ADP1. Ce travail a également amené à revisiter expérimentalement les voies de biosynthèse de la L-méthionine et de la L-cystéine.

1.4.3 Biosynthèse de la L-cystéine

Chez ADP1, la L-cystéine est biosynthétisée à partir du sulfate via la production de sulfites. Tout d'abord, le sulfate est activé en adénylyl sulfate par une ATP sulfurylase, enzyme à deux sous-unités CysD (ACIAD1072) et CysN (ACIAD1073), comme chez les Enterobacteriaceae. Chez *E. coli* par exemple, ce produit est phosphorylé par une APS kinase (CysH_{K12} ; Uniprot ID : P17854) mais aucun homologue n'a été retrouvé chez ADP1. Par contre, chez *B. subtilis*³⁸⁶ et *P. aeruginosa*³⁸⁷ il a été montré que l'assimilation du sulfate est réalisée via la production d'adénosine 5'-phosphosulfate comme chez les plantes via une APS réductase également appelée CysH (figure 77). À noter que l'APS réductase et l'APS kinase sont toutes les deux appelées CysH, ce qui introduit une confusion. CysH_{aeruginosa} (Uniprot ID : O05927) possède le groupe fer-soufre qui détermine la spécificité APS des enzymes qui réduisent le sulfate.

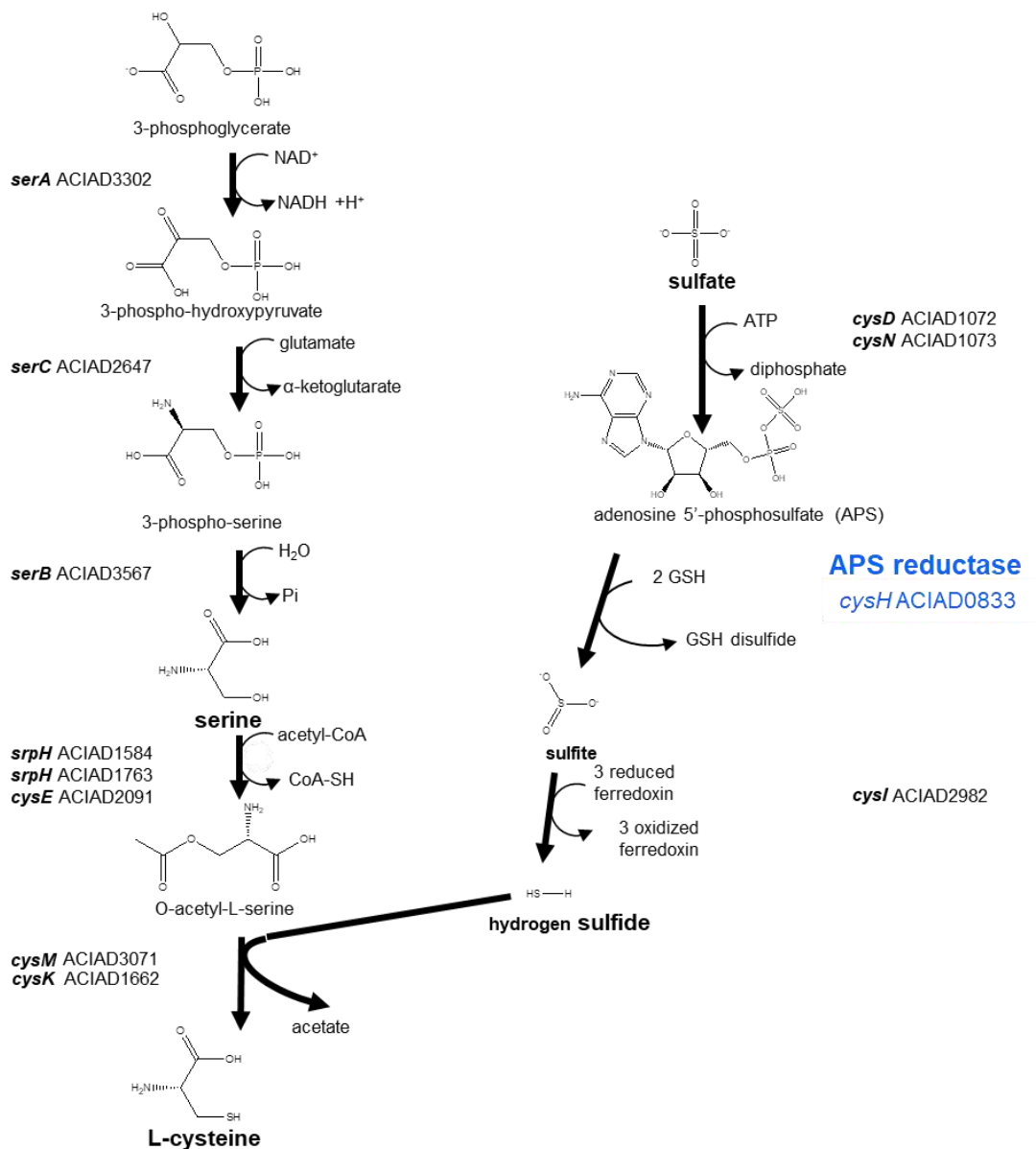


Figure 77 : Biosynthèse de la L-cystéine à partir de sulfate chez ADP1.

L'orthologue de CysH_{aeruginosa} (O05927) chez ADP1 est l'ACIAD0833 (66% d'identité). Il est à noter que le gène de *P. aeruginosa* a été identifié comme impliqué dans la formation des biofilms et constitue ainsi une cible génétique pour traiter les infections à *P. aeruginosa*³⁸⁸. Ce gène pourrait également être une bonne cible pour traiter les infections causées par les souches pathogènes du genre *Acinetobacter*. Le sulfite produit par CysH est réduit en H₂S par CysI (ACIAD2982) et CysJ (ACIAD0799) avant que le soufre ne soit incorporé à l'O-acétyl-L-sérine via les deux cystéines synthases CysM (ACIAD3071) et CysK (ACIAD1662). Chez ADP1, l'ensemble des gènes impliqués dans les étapes décrites précédemment sont essentiels sur sulfate, sauf *cysK* et *cysM* qui sont capables de compenser l'absence de l'autre en présence de sulfate. Il est aussi à noter que l'on trouve trois L-sérine acétyltransférases (SAT) chez ADP1 : deux SrpH-like (74% d'identité entre elles) qui partagent un peu plus de 50% d'identité avec SrpH de *Synechococcus elongatus*⁷ (Uniprot ID : Q59967) et CysE, comme chez *B. subtilis* ou *E. coli*.

1.4.4 Sources alternatives du sulfate

Le sulfate est la source de soufre préférée de la plupart des bactéries, mais dans la plupart des environnements naturels, la disponibilité du sulfate est limitée³⁸⁹. Kertesz relate que les sulfonates et les esters sulfatés sont beaucoup plus abondants que les sulfates et, par conséquent, de nombreuses bactéries ont des mécanismes adaptés pour utiliser ces composés comme sources alternatives de soufre. Lors de conditions de limitation en sulfate, *E. coli* et de nombreuses autres bactéries synthétisent un ensemble de protéines induites par la pénurie des sulfates. Cet ensemble de protéines synthétisées dans ces conditions particulières sont des protéines dites « sulfate starvation-induced proteins » (protéines SSI, de carence en sulfate) qui ne sont donc synthétisées qu'en l'absence des "sources de soufre préférées", qui varient selon les espèces, mais comprennent le sulfate, la cystéine et le thiocyanate. Aucune étude avant mon arrivée au laboratoire n'avait été entamée sur le sujet et les capacités d'assimilation d'ADP1 des molécules soufrées n'avaient jamais été testées.

Cependant, selon l'annotation, on retrouve chez ADP1 les clusters de gènes *ssuABCD* (ACIAD0034 à ACIAD0038) et *msuDE* (ACIAD3470-3471) impliqués dans le transport et la désulfuration des alkanesulfonates, mais aucune étude expérimentale n'a été réalisée pour étudier la capacité d'ADP1 à métaboliser ces sources de soufre avant mon travail de thèse. À noter que l'on ne trouve pas de gène *ssuE* codant pour la réductase de SsuD dans le cluster de gène *ssu*.

En termes de régulation, on ne trouve pas non plus les grands régulateurs des voies métaboliques liées au soufre décrits chez de nombreux organismes : ni CysB pourtant retrouvée chez les *Pseudomonas*, ni CymR, CysR, CysL et enfin ni MetJ n'ont d'homologues chez ADP1. Seul le régulateur Cbl (ACIAD2597) est retrouvé chez ADP1, co-localisé avec le transporteur du sulfate CysAWTP, suggérant que les gènes notamment *ssu* doivent pouvoir être régulés chez ADP1. Cependant, aucune étude avant la nôtre ne s'est intéressée à cette problématique chez ADP1.

II Matériel et méthodes

2.1 Projet ADP1

Le clonage des gènes d'ADP1 (constituant l'ORFéome, ressource commune au laboratoire), a été réalisé avant mon arrivée via une technique appelée Ligation Independent Cloning (LIC, méthode décrite par Aslanidis et de Jong³⁹⁰ ne nécessitant pas d'enzymes de restriction), selon le protocole décrit pour la plateforme de clonage par Vergne et al.³⁹¹ et ne sera donc pas décrit ici. Le principe est cependant détaillé en annexe 3.

2.1.1 Surexpression et purification des enzymes solubles de l'ORFéome

2.1.1.1 Transformation bactérienne

La collection d'enzymes issues d'ADP1 (ORFéome ADP1) se trouve sous forme de plasmides répartis en microplaques 96 puits. Chaque plasmide recombiné contenant le gène d'intérêt (ACIADxxxx) est inséré par choc thermique dans une souche d'*E. coli* permettant la surexpression protéique (BL21 (DE3) CD+™RIPL d'Agilent® ou BL21 (DE3) STAR™ de LifeTechnologies®). Le principe de la transformation repose sur le fait que les membranes de la souche hôte, préalablement rendue « compétente », sont rigidifiées par une température basse et stabilisées par le CaCl₂. Le choc thermique accroît la perméabilité de la membrane bactérienne et favorise l'entrée de l'ADN transformant.

Les plaques de cellules compétentes sont décongelées sur glace et 1 µL de plasmide déjà extrait à partir de cellules de clonage *E. coli* Novablue est ajouté dans chaque puits. La plaque est laissée 30 min sur glace avant d'être placée à 42 °C au bain thermostaté pendant 1 min, puis à nouveau sur la glace.

Une fois le vecteur transféré dans les bactéries, celles-ci sont placées dans 100 µL de milieu commercial riche SOC d'Invitrogen (Super Optimal broth with Catabolite repression). Il s'agit en fait d'un milieu SOB pH 7 modifié contenant du tryptone 2 %, de l'extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, et du glucose 20 mM. Ce milieu permet aux bactéries de se régénérer et d'exprimer la résistance plasmidique : elles sont ainsi placées à l'étuve à 37 °C pendant 1h. Puis pour chaque puits, 125 µL de produit de transformation sont transférés dans une macroplaque sur laquelle a été précédemment distribué 1 mL de milieu LB (bouillon lysogène, bactotryptone 10 g.L⁻¹, extrait de levure 5 g.L⁻¹, NaCl 170 mM) contenant de la carbénicilline (carbé) à 50 µg.mL⁻¹. Les macroplaques sont mises à 37 °C sous agitation au Kühner à 500 rpm toute la nuit. Le lendemain, 30 µL par puits sont utilisés pour ensemercer 1mL de LB+carbé à 50 µg.mL⁻¹. Les nouvelles macroplaques sont incubées comme la veille à 37 °C toute la nuit sous agitation à 500 rpm.

2.1.1.2 Induction à l'IPTG

Des sauvegardes des plaques incubées la veille sont préparées en présence de glycérol et stockées à -80 °C. Pour cela, des aliquots de préculture sont prélevés et mélangés à 10% de glycérol.

Après obtention d'une biomasse suffisante, l'expression hétérologue des enzymes à PLP d'ADP1 dans les bactéries *E. coli* a été induite par l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), analogue non hydrolysable du lactose. Celui-ci entraîne le désencombrement du promoteur pour la transcription de l'ARN polymérase T7 présente dans les souches *E. coli* BL21, permettant ainsi d'induire la transcription des enzymes à PLP. Les nouvelles cultures sont réalisées en milieu TB (TB Terrific Broth), enrichi en sorbitol et bétaïne qui permettent ainsi d'améliorer la solubilité des protéines et de diminuer les risques de formation de corps d'inclusion par les protéines surexprimées. Le milieu TB/sorbitol-bétaïne (pH $7,2 \pm 0,2$ à 25°C) est constitué de : tryptone 12 g.L^{-1} , extrait de levure 24 g.L^{-1} , KH_2PO_4 $9,4 \text{ g.L}^{-1}$, K_2HPO_4 $2,2 \text{ g.L}^{-1}$, sorbitol 91 g.L^{-1} (0,5 M) et bétaïne (5 mM). Dans de nouvelles macroplaques, chaque puits contenant 1,6 mL de TB/sorbitol-bétaïne + carbé à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ est inoculé avec 50 μL de la préculture. Les plaques sont ensuite placées à 37°C au Kühner à 500 rpm pendant environ 4h, jusqu'à une densité optique (DO) optimale du milieu de culture située entre 0,8 et 1,2 à 600 nm (mesure DO_{600} effectuée au spectrophotomètre UV/Visible Ultrospec2000 ; PharmaciaBiotech). Le milieu TB permet une production de biomasse plus importante : ainsi dans cet intervalle de D.O., la culture se trouve encore en phase exponentielle et l'induction peut être déclenchée par l'ajout de 1 mM d'IPTG. La culture est alors incubée à 20°C sous agitation au Kühner à 500 rpm sur la nuit.

Les macroplaques de culture ont ensuite été centrifugées à 4000 tr.min^{-1} pendant 20 min à 4°C . Après élimination du surnageant, les plaques sont stockées à -80°C .

Pour vérifier la surexpression, des aliquots de culture sont prélevés avant centrifugation. Ils sont placés dans une microplaque 96 puits et congelés à -80°C pendant 1h minimum afin de fragiliser les cellules. Ensuite, 10 μL sont déposés sur gel pré-coulé E_PAGE™48 8 % suivant le protocole du fournisseur (Novex, Invitrogen®). Avant dépôt, les cellules et les protéines sont dénaturées pendant 10 min à 99°C au thermocycleur (AppliedBiosystems, GeneAmp® PCR System9700).

Après 30 min de migration, les gels sont placés 1h dans un bain de fixateur (solution aqueuse contenant 10 % d'acide acétique et 30 % d'éthanol), puis 3h dans un bain de bleu de Coomassie (coloration des acides aminés basiques et aromatiques). Les gels sont enfin mis à décolorer dans l'eau. La surexpression protéique est contrôlée visuellement.

Pour la caractérisation d'enzymes individuelles, une plus grande quantité de protéines est nécessaire et, dans ce cas, un volume de culture plus important est préparé. Tout d'abord, une étape de réisolement de colonies sur boîte de Petri (LB+ carbé $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) est effectuée à partir de la souche sauvegardée. Une colonie est ensuite prélevée afin d'ensemencer 10 mL de LB + carbé à $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Cette préculture est alors incubée une nuit au shaker à 37°C (200 tr.min^{-1}). Une culture de 400 ml de TB/Sorbitol-bétaïne + carbé $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ est inoculée avec 8 mL de préculture dans un erlenmeyer. Le volume de culture doit représenter environ 1/5 du volume total de l'erlenmeyer, assurant ainsi une bonne oxygénation et une meilleure croissance des cellules. L'induction et le dépôt sur gel sont réalisés suivant le protocole décrit précédemment. La culture est enfin centrifugée à $10500 \text{ tr.min}^{-1}$ et les culots conservés à -80°C avant la lyse.

2.1.1.3 Lyse cellulaire et dosage des protéines extraites

Pour isoler les protéines totales, les cellules sont lysées enzymatiquement par le lysozyme, qui détruit la paroi bactérienne, mais aussi par action mécanique en soniquant.

Après décongélation des plaques, les culots de chaque puits sont resuspendus dans 300 μL de tampon de lyse contenant 50 mM de tampon K-phosphate pH 8, 500 mM NaCl, 15 % de glycérol (pour la congélation ultérieure des lysats), 10 mM d'imidazole, 1 mM de Pefabloc (inhibiteur de protéase à sérine) et 0,07 % (v/v) de Lysonase™ Bioprocessing Reagent (Novagen), qui comprend du lysozyme et une endonucléase dégradant l'ARN et l'ADN. Les plaques sont mises sous agitation à température ambiante pendant 20 min pour permettre à la lysonase d'agir. Elles sont ensuite placées dans un bain à ultrason (Branson Ultrasonics), rempli d'eau glacée. Après une étape de dégazage de 5 min, une sonication de 15 min est nécessaire afin de rompre à la fois les membranes cellulaires et les agrégats moléculaires. Les plaques sont centrifugées à 6200 $\text{tr}\cdot\text{min}^{-1}$ pendant 20 min à 4 °C. Le surnageant est ensuite prélevé à l'aide d'un robot à tête 96 de type Robbins Hydra™⁹⁶, et transféré dans une microplaque. Le robot est nettoyé entre deux plaques par une série de cycles de lavages eau/éthanol.

Enfin, un dosage des protéines est fait via la méthode de Bradford. La solution de Bradford (BioRad®) est diluée au 1/5^{ème} et une gamme étalon de BSA allant de 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ à 1,4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ est réalisée. Puis, 4 μL d'échantillon (BSA ou lysat) sont ajoutés à 200 μL de Bradford dilué sur une plaque de microtitration Greiner Bio-One (Dutscher). Si la D.O. indiquée se trouve hors gamme, les échantillons de lysat sont dilués. La lecture des plaques se fait à 595 nm au spectrophotomètre SPECTRA_{max}PLUS³⁸⁴ (Molecular Devices) avec le logiciel SoftMax Pro. Un dépôt sur gel des lysats est également effectué selon le protocole décrit en 2.1.1.2.

À noter que pour la caractérisation d'enzyme individuelle, l'étape de sonication est réalisée à l'aide de l'appareil Ultrasonic Processor, du fait du volume important de cellules. Trois à cinq cycles de 3 x 30 s et une sonde de 13 mm vibrant à une amplitude de 25% ont été nécessaires. La lyse est suivie au spectrophotomètre SAFAS Monaco, avec un balayage de 400 à 640 nm. Après centrifugation à 12000 rpm pendant 20 min, le lysat (surnageant) est déposé sur gel SDS-PAGE NuPAGE™ 12% Bis-Tris (tampon de migration MOPS) et la concentration protéique dosée via la méthode du Bradford.

2.1.1.4 Purification His-Tag - chromatographie d'affinité

La purification des protéines à PLP en plaque a été réalisée à l'aide du kit HisLink™ Protein Purification Resin (Promega). Pour chaque puits, 80 μL de billes de résine sont ajoutés. La plaque est ensuite laissée 15 min sous agitation à 4 °C, puis les billes sont resuspendues avant de laisser à nouveau la plaque 15 min sous agitation. Le lysat et les billes sont ensuite transférés dans une plaque de filtration, et le liquide est éliminé sous-vide. Les puits sont lavés avec 300 μL de tampon de lavage (composition identique au tampon de lyse). Puis 2 fois 100 μL de tampon d'élution sont ajoutés. Celui-ci est constitué de 50 mM de tampon K-phosphate pH 8, 500 mM NaCl, 15 % de glycérol, 250 mM d'imidazole. Le liquide contenant les protéines est ainsi récupéré en deux fois sous-vide et dosé par Bradford selon le protocole décrit en 2.1.1.3.

La purification des protéines à PLP individuelles a été réalisée via les colonnes Qiagen Ni-NTA à 4 °C. Le nombre de colonnes utilisées pour la purification des protéines est choisi en fonction de la concentration du lysat : 2 colonnes si la concentration se situe entre 9 et 15 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 4 colonnes si l'échantillon est plus concentré et 1 s'il l'est moins. Tout d'abord, chaque colonne est équilibrée avec 600 μL de tampon de lyse et centrifugée 1 min à 2900 rpm. Le lysat est ensuite déposé sur la colonne en plusieurs fois par volumes de 600 μL , le liquide étant éliminé par centrifugations successives de

1 min à 1600 rpm. La protéine fixée sur la colonne est ensuite lavée 3 fois avec 600 µL de tampon de lyse via centrifugation 1 min à 2900 rpm. Enfin la protéine est éluée avec 2 fois 100 µL de tampon d'éluion (identique à celui utilisé pour l'éluion en plaque). Le dosage et le dépôt sur gel se font selon le protocole décrit en 2.1.1.3.

2.1.2 Construction du mutant de délétion $\Delta cysI$ essentiel sur sulfate

Le mutant $\Delta cysI$ (ACIAD2982) n'a pas été obtenu lors de l'obtention de la collection complète de mutants knock-out d'ADP1 obtenu en milieu minimum⁷³. J'ai donc appris la technique de délétion auprès de Nadia Perchat qui devait faire des mutants d'ADP1 pour un autre projet et l'ai appliquée à la construction du mutant $\Delta cysI$ (ACIAD2982) selon le protocole décrit par de Berardinis et al.⁷³ L'approche utilisée pour la délétion de gènes est basée sur le fait qu'*A. baylyi* ADP1 est naturellement compétente et a la capacité de réaliser efficacement des recombinaisons homologues avec des fragments d'ADN linéaires³⁷⁵. Les étapes de cette stratégie de délétion sont les suivantes :

- Amplification par PCR (PCR 1) d'une cassette portant le gène de résistance à la kanamycine. La cassette de la kanamycine a été préalablement amplifiée par le laboratoire qui en conserve un large stock.
- Amplification par PCR (PCR 2 et 3) des deux régions flanquantes du gène à déléter en utilisant des amorces qui possèdent une extension complémentaire de la cassette. Les cycles de PCR sont décrits dans le tableau 4.
- Les trois produits PCR sont mélangés pour générer un fragment linéaire (PCR multiplex). Les cycles de PCR sont décrits dans le tableau 5.

Température (°C)	95	95	55	72	72
Temps (min)	10	1	1	1,5	10
Répétition (cycle)	1	29			1

Tableau 4 : Programme des PCR 2 et 3 (description des cycles en fonction des durées et des températures).

Température (°C)	95	95	55	72	72
Temps (min)	1	1	1	3,5	10
Répétition (cycle)	1	26			1

Tableau 5 : Programme de la PCR multiplex (description des cycles en fonction des durées et des températures).

- Le produit issu de la PCR multiplex est directement utilisé pour transformer des cellules d'ADP1 qui seront ensuite sélectionnées, soit sur une gélose LB-kanamycine, soit sur une gélose MAS-kanamycine complémentée avec de la L-cystéine comme source de soufre (à 0,3 mM) nécessaires à l'obtention du mutant $\Delta cysI$. Le milieu MAS (milieu *Acinetobacter* succinate) se compose de : Na₂HPO₄ (31 mM), KH₂PO₄ (25 mM), NH₄Cl (18 mM), acide nitrilotriacétique (41 mM), MgSO₄ (2 mM), CaCl₂ (0.45 mM), FeCl₃ (3 mM), MnCl₂ (1 mM), ZnCl₂ (1 mM), (CrCl₃, H₃BO₃, CoCl₂, NiCl₂, Na₂MoO₄, Na₂SeO₃ (0.3 mM), et enfin du succinate 25 mM comme source de carbone.

2.1.3 Phénotypage de la banque de mutants

L'ensemble des produits chimiques utilisés pour le phénotypage des mutants ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Merck), Acros Organics ou FisherScientific.

2.1.3.1 Phénotypage complet en plaque 96 puits

La campagne de phénotypage complet de la banque de 2593 mutants KO répartis sur 28 plaques « stock » a été réalisée sur 6 sources de soufre : L-méthionine, L-cystéine, thiosulfate, S-méthyl-L-cystéine, L-méthanesulfonate et taurine. Par séries de 5 plaques, les mutants sont remis en culture en macroplaque 96 puits en milieu MP (milieu *putida*) complet pH 7,1. Celui-ci contient : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3,7 g.L⁻¹, KH_2PO_4 0,65 g.L⁻¹, NH_4Cl 1,07 g.L⁻¹, FeCl_2 1 mg.L⁻¹, MgCl_2 0,19 g.L⁻¹, MgSO_4 0,24 g.L⁻¹, succinate de sodium 4,05 g.L⁻¹. Chaque puits contenant ainsi 1,2 mL de milieu MP complet estensemencé avec 5 μL de glycérol des mutants ; ces plaques mères sont mises en cultures à 30 °C (500 rpm) sur la nuit. Les mutants sont ensuite mis en préculture sur microplaque 96 puits en duplicas : chaque puits contenant 200 μL de milieu MP complet estensemencé avec 5 μL de culture en macroplaque. Les précultures sont placées à 30 °C sous agitation sur la nuit. Celles-ci sont enfin utilisées pour ensemenecer les 6 cultures en milieu MP modifié où les sulfates sont remplacés par une nouvelle source de soufre, toujours à 2 mM. Après ~15 h de culture à 30°C, la DO_{600} est lue via le spectrophotomètre SPECTRA_{max}PLUS³⁸⁴ et vérifiée à l'œil nue afin d'éviter les erreurs de lecture liées à la formation de biofilms ou d'agglomérats cellulaires.

2.1.3.2 Phénotypage en plaque Bioscreen

Les mutants conservés à -80 °C en glycérols 15 % non auxotrophes à la méthionine ou à la cystéine, ainsi que la souche sauvage d'ADP1, sont remis en culture sur gélose MAS-agar (15 g d'agar pour 1 L de milieu MAS) sur une nuit et conservés 2 semaines maximum à 4 °C. Les mutants auxotrophes sont quant à eux remis en culture sur gélose LB-agar. Les précultures ont été réalisées dans 5 mL de milieu MP complet (cf. composition section 2.1.3.1), à 30 °C sur une nuit et à 150 rpm. Pour les mutants dont les gènes délétés sont essentiels sur MgSO_4 , la source de soufre a été remplacée en préculture soit par la L-méthionine (comme c'est le cas par exemple pour le mutant ΔmetZ) soit par la L-cystéine (comme c'est le cas du mutant ΔcysI), à 2 mM. Puis les précultures sont lavées 3 fois avec 5 mL de milieu MP sans fer non complété (composition : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3,7 g.L⁻¹, KH_2PO_4 0,65 g.L⁻¹) : pour chaque cycle de lavage, la préculture est centrifugée à 4000 rpm pendant 8 min à 20 °C, le surnageant éliminé et le culot resuspendu. Les 200 μL du milieu MP complété avec la source de soufre à tester à 2 mM sont répartis sur la plaque dans 4 puits, formant les répliques techniques de culture. Les puits extérieurs sont remplis avec de l'eau. Chaque puits est ensuiteensemencé avec 2 μL de préculture lavée. Les plaques sont finalement placées dans l'appareil Bioscreen pour 24h à 48h de culture à 30 °C, sous agitation continue, à amplitude haute et vitesse normale. L'agitation des cultures est stoppée 5 s avant chaque mesure de DO_{600} , effectuée toutes les 15 min. Un duplica biologique (à partir de nouvelles précultures) de chaque expérience est réalisé par la suite sur une nouvelle plaque.

2.1.3.3 Synthèse du MTR à partir du MTA

L'hydrolyse acide du MTA commercial en vue d'obtenir le MTR a été réalisée d'après le protocole fourni par A. Sekowska. Dans un tube eppendorf de 2 ml, 0,059 g de MTA sont introduits avec 1ml de HCl 1N. Une fois le bouchon du tube percé, celui-ci est placé dans un block chauffant à 100 °C pendant 2 heures. La solution devient marron. Le suivi réactionnel a été effectué par chromatographie sur couche mince (CCM) avec des feuilles à dos d'aluminium avec du gel de silice 60 F254 (Merck), avec comme éluant un mélange dichlorométhane/ammoniaque (8/2) ; les révélateurs utilisés pour la détection du MTA et du MTR sont l'UV et le KMnO_4 , respectivement. Une fois l'hydrolyse totale atteinte, la solution est neutralisée à pH 7 avec du NaOH 5N. La solution de MTR obtenue d'environ 0,2 M est ensuite filtrée à 0,22 μm via un filtre à membrane MCE MF-Millipore™.

2.1.4 Analyses spectrophotométriques

2.1.4.1 Détection de l'ammoniaque : test couplé à la glutamate déshydrogénase (GDH)

Le test d'activité couplé à la GDH s'effectue en deux temps : (1) une réaction réalisée par une enzyme à PLP à l'activité MGL, CBL ou encore CGL, libère du NH_3 dans le milieu réactionnel ; (2) un dosage du NH_3 formé pendant la première étape par un test couplé avec la GDH.

(1) La réaction catalysée par une lyase sur la L-méthionine ou la L-cystathionine est réalisée à TA durant une nuit dans un volume réactionnel de 100 μL contenant 100 mM de tampon K-Phosphate pH 7,5, 20 μM de PLP, 5 mM de substrat, et 10 μL de protéine purifiée issue de la plaque d'enzymes à PLP (de 0,05 à 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en concentration initiale). Pour la plaque témoin, permettant d'estimer le bruit de fond éventuel, le substrat est remplacé par de l'eau. Un témoin sans enzyme est aussi préparé. La plaque est recouverte d'un film adhésif le temps de la réaction.

(2) La réaction utilisant la GDH pour le dosage du NH_3 est également réalisée à TA dans un volume final de 200 μL contenant 100 mM de tampon K-phosphate pH 8, 10 mM d' α -cétoglutarate, 300 μM de NADH, 100 μM d'ADP et 3,15 unités. mL^{-1} de GDH. Elle est déclenchée par l'ajout de la totalité du milieu de la réaction (1). La cinétique de conversion du NADH en NAD^+ est suivie à 340 nm pendant environ 1 h au spectrophotomètre SPECTRA_{max}PLUS³⁸⁴.

2.1.4.2 Test couplé à la GDH et détection de l'activité Met-TAM

Le test d'activité couplé à la GDH a été adapté à l'exploration de l'activité L-Met-TAM. Deux réactions sont également successivement réalisées : dans un premier temps, la réaction de transamination est effectuée à TA durant une nuit dans un volume réactionnel de 100 μL contenant 100 mM de tampon K-Phosphate pH 7,5 20 μM de PLP, 10 mM de L-méthionine et 10 mM d' α -cétoglutarate, et 10 μL de protéine purifiée issue de la plaque d'enzymes à PLP (de 0,05 à 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Puis dans un second temps, la réaction utilisant la GDH pour le dosage du glutamate formé, également

réalisée à TA, est réalisée dans un volume final de 200 μL contenant 100 mM de tampon K-phosphate pH 8, 100 μM d'ADP, 300 μM de NAD^+ et 3,15 unités. mL^{-1} de GDH. Elle est déclenchée par l'ajout de la totalité du milieu de réaction supposée Met-TAM. La cinétique de conversion du NAD^+ en NADH est suivie à 340 nm pendant environ 1 h au spectrophotomètre SPECTRA_{max}PLUS³⁸⁴.

2.1.4.3 Détection du pyruvate : test couplé à la lactate déshydrogénase (LDH)

Le test d'activité couplé à la LDH permettant de détecter une activité CBL chez les enzymes à PLP a été réalisé en deux temps. D'abord, la réaction CBL est effectuée à TA durant une nuit dans un volume réactionnel de 100 μL contenant 50 mM de tampon Tris-HCl pH 8, 20 μM de PLP, 5 mM de L-cystathionine, et 10 μL de protéine purifiée issue de la plaque d'enzymes à PLP (de 0,05 à 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Puis, la réaction utilisant la LDH pour le dosage du pyruvate formé, également réalisée à TA, est réalisée dans un volume final de 200 μL contenant 50 mM de tampon Tris-HCl pH 8, 300 μM de NADH et 6 unités. mL^{-1} de LDH. Elle est déclenchée par l'ajout de la totalité du milieu de réaction CBL. La cinétique de conversion du NADH en NAD^+ est suivie à 340 nm pendant environ 1 h au spectrophotomètre SPECTRA_{max}PLUS³⁸⁴.

Toute autre activité β -lyase libérant du pyruvate (telle l'activité CD) mesurée sur enzyme purifiée en tube a été détectée à l'aide du spectromètre SAFAS_{Monaco} UVmc2 en double cuve. La composition du milieu réactionnel est similaire à celui utilisé pour les tests en plaque, cependant : la concentration en NADH dans chaque cuve est de 200 μM ; chacune contient 0,03 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ final d'enzyme purifiée ; et la réaction est déclenchée par l'ajout du substrat (L-cystéine, L-sérine, O-acétyl-L-sérine...) dans une des deux cuves, et la réaction couplée à la LDH est suivie en temps réel.

2.1.5 Détection de l'activité cystathionine- β -synthase par LC-MS

L'exploration de l'activité CBS a été réalisée à TA dans un volume final de 100 μL contenant : 50 mM de tampon Tris-HCl pH 8, 20 μM de PLP, 10 mM de DL-homocystéine, 5 mM de L-sérine ou O-acétyl-L-sérine. La réaction est déclenchée par l'ajout de l'enzyme à la concentration finale de 0,06 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Après 20 min, le milieu réactionnel est filtré par centrifugation à 10000 g pendant 15 min à 4 °C, à l'aide de filtres PES modifié VWR 3K. Les échantillons sont ensuite dilués au $\frac{1}{4}$ dans la phase mobile (80 % ACN et 20 % de phase aqueuse carbonate d'ammonium 10 mM ; pH ajusté à 10 avec le NH_4OH). La détection de la cystéine s'est faite par LC-MS via le spectromètre de masse Orbitrap Elite™. Les séparations HPLC ont été effectuées sur colonne ZIC®-HILIC (5 μm , 200Å), 50 x 4,6 mm, thermostatée à 15 °C, avec un débit de 500 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. La phase mobile A est constituée de carbonate d'ammonium 10 mM (pH 10), et la phase B d'ACN. Le gradient utilisé est de 80 % de B pendant 2 min, suivi d'un gradient linéaire de 20 min jusqu'à 40 % de B, puis de 8 minutes supplémentaires à 40 % de B. Le système revient à sa composition initiale en 5 minutes et est rééquilibré dans ces conditions pendant 15 min.

2.1.6 Transcriptomique

L'extraction et la préparation des ARN d'ADP1 pour le RNAseq s'est faite en conditions RNase-free (ports de gants, matériel RNase-free ou lavé à l'éthanol). Les précultures ont été réalisées en milieu MP complété comme défini précédemment (avec comme sources de soufre utilisées le MgSO_4 , la L-méthionine et la L-cystéine à 2 mM).

2.1.6.1 Extraction des ARNs au TRIZOL MAX

Le tampon phénol d'extraction-stabilisation a été préparé comme suit : 5 mL de phénol sont ajoutés à 5 mL d'acétate de sodium 1 M pH 5,5, puis centrifugés à 4000 rpm pendant 3 min. La phase inférieure (~5mL) est récupérée puis divisée en 2 x 2,1 mL. Puis 39,9 mL d'éthanol 100 % sont ajoutés à chaque fraction, afin d'obtenir une solution finale à 5 % de phénol conservée à 4°C.

Pour chaque source de soufre utilisée pour la croissance de la souche sauvage d'ADP1, 3 précultures/cultures ont été réalisées. En tout, 9 précultures/cultures ont été réalisées pour 27 extractions. La préculture est réalisée sur la nuit à 30 °C et 150 rpm. Les cultures de 15 mL sont ensemencées au 1/50^{ème} à partir des précultures. Une fois la culture en phase exponentielle ($\text{DO}_{600} \sim 0,8$), 1,9 ml de tampon phénol froid est ajouté et le tout vortexé puis placé sur glace. Trois aliquots de 1,5 mL par culture sont transférés dans 3 tubes de 2 mL et centrifugés à 6000 g pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans 1ml de réactif TRIZOL™ ; les tubes sont alors homogénéisés et incubés 5 min à température ambiante (TA). Puis 200 μL de chloroforme sont ajoutés et les tubes agités vigoureusement manuellement pendant 15 secondes. Après 2-3 min d'incubation à TA, ils sont centrifugés 15 min à 12000 g. On peut alors observer 3 phases : une phase supérieure aqueuse incolore, contenant l'ARN, une interphase contenant l'ADN, et une phase inférieure organique phénolique colorée contenant protéines et lipides. Les ~ 425 μL de la phase aqueuse sont récupérés et transférés dans un nouveau tube afin d'y ajouter 500 μL d'isopropanol froid (4 °C) : le tout est mélangé par renversement puis incubé 10 min à TA avant d'être centrifugé 10 min à 15000 g. Le surnageant est ensuite éliminé prudemment et le culot resuspendu dans 1 mL d'éthanol 75 % ; le tout est vortexé puis centrifugé 5 min à 7500 g. Le surnageant est à nouveau prudemment éliminé et le culot séché à l'air libre (avec le tube tête à l'envers). Enfin, le culot est resuspendu dans 30 μL d'eau RNase free (Invitrogen™). 1 μL a été utilisé afin d'estimer la quantité d'ARN au Nanodrop (à 260 nm) ainsi que la qualité relative (ratio 260/280 nm pour la présence éventuelle de protéines et 260/230 nm pour celle de contaminants organiques, de solvants ou de sels). Si besoin, après cette étape d'extraction mais avant traitement DNase, l'échantillon peut être congelé à -80 °C.

2.1.6.2 Traitement à la DNase TURBO

Le traitement des ARNs extraits a été réalisé à l'aide du kit DNase TURBO AM1907 (Ambion). Un pool de milieu réactionnel a été préparé avant d'être ajouté aux 3 tubes contenant chacun 29 μL d'ARN. Celui-ci contient : 15 μL de tampon 10X TURBO, 3 μL de DNase TURBO (soit 2U) et 45 μL d' H_2O RNase free. 21 μL de ce pool ont été distribués dans chaque réplica d'extraction. Les tubes ont été

agités sans être vortexés puis incubés 30 min à 37 °C. 2 µL de DNase TURBO ont été ajoutés et les tubes réincubés 30 min à 37°C.

2.1.6.3 Purification et fractionnement des ARNs

La purification a été réalisée à l'aide du kit RNA Clean and Concentrator-5 de Zymo Research (capacité 5/10 µg). Le volume des échantillons est d'abord ajusté à 50 µL avec de l'eau RNase-free. Puis un mélange tampon RNA Binding 150 µL + éthanol 100 % 150 µL est ensuite préparé : 100 µL sont ajoutés à chaque échantillon de manière à avoir 1 volume d'échantillon pour 2 volumes du mélange tampon RNA Binding + éthanol. Puis les échantillons sont transférés sur colonnes et centrifugés 1 min à 12000 g.

Les petits ARNs (17 à 200 nt) se retrouvent alors dans le « flow-through » (FT), soit 150 µL par tube de réception. Un volume équivalent d'éthanol y est ajouté. Les 300 µL sont mélangés avant d'être transférés sur une nouvelle colonne puis centrifugés 1 min à 12000 g ; puis le FT est éliminé.

Par la suite, pour tous les échantillons (contenant soit les grands soit les petits ARNs), 400 µL de tampon RNA Prep sont ajoutés sur la colonne. Celles-ci sont à nouveau centrifugées 1 min à 12000 g : le FT est éliminé, puis 800 µL de tampon RNA Wash (activé à l'ouverture avec 24 mL d'éthanol 100 %) sont ajoutés. Après centrifugation de 30 s à 12000 g, le FT est à nouveau éliminé et 400 µL de tampon RNA Wash sont ajoutés. Une nouvelle centrifugation de 30 s à 12000 g permet d'éliminer le tampon de lavage et le tube de réception est changé. Les colonnes sont ensuite séchées par centrifugation 12000 g pendant 2 min. Enfin, 10 µL d'eau RNase-free sont ajoutés pour incubation à TA pendant 4 min. Après centrifugation à 10000 g pendant 30 s, le FT contenant l'ARN est conservé et 10 µL d'eau RNase-free sont à nouveau ajoutés (incubation 4 min à TA). Après une dernière centrifugation à 10000 g pendant 30 s, un dosage au NanoDrop est effectué avec 1 µL de FT. Un contrôle visuel des échantillons est aussi effectué en déposant ~400 ng d'ARN sur gel d'agarose 1 % RNase-free (tampon de migration TBE 10%). Migration à 200 V pendant 30 min. Les échantillons ont ensuite été transmis au laboratoire de séquençage, qui effectue la déplétion des ARNr avant d'appliquer le protocole de séquençage illustré en annexe 9.

2.2 Projet SAT/SST

La L-homosérine, la L-sérine, l'acétyl-CoA, le succinyl-CoA, le pyridoxal phosphate (PLP), le β-nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), l'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), ont été commandés chez Sigma-Aldrich (Merck). Les gènes synthétiques comprenant des codons optimisés ont été fournis par Genewiz (via Sigma-Aldrich). Les souches *S. pombe* DSM 70576 et *X. campestris* DSM3586 sont issues de la collection DSMZ. Le mutant *S. pombe* Δ*cys2* (KP2990; h- leu1-32 *cys2*-1) a été fourni par YGRC/NBRP - Japon (Δ*cys2* est appelé FY17212 dans la collection YGRC/NBRP).

2.2.1 Clonage et surexpression des SST

Le clonage des gènes de la plupart des MetA et MetX HAT/HST et d'un certain nombre d'enzymes Cys2 et Cys2-like (hormis les MetX eucaryotes non ascomycètes) a été réalisé avant mon arrivée. Les amorces sens ont été définies de manière à introduire une étiquette hexahistidine à l'extrémité N des protéines après la méthionine, à des fins de purification. Les séquences ont été clonées dans le plasmide pET22b (+) (Novagen) modifié pour le clonage LIC. Des extensions spécifiques ont été ajoutées aux amorces pour le clonage dans ce plasmide d'expression ; les amorces sont rapportées dans le Set 1 de données supplémentaires de l'article Bastard & Perret et al.⁶² Les amorces des gènes des MetX/Cys2-like eucaryotes non ascomycètes de *Phytophthora parasitica* (Uniprot ID : W2JD21), *Ciona savignyi* (Uniprot ID : H2YKH8), *Candida antarctica* (Uniprot ID : A0A081CL69) et *Toxoplasma gondii* (Uniprot ID : V4YNK0) sont décrits ci-après :

- Amorces avec Histag en 5' :

```
W2JD21.opt_5PRIM AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATCTGGCGCGTCGTATC
W2JD21.opt_3PRIM GTGTAATGGATAGTGATCTTACAGAGAAGAGTAACGGTGTC
H2YKH8.opt_5PRIM AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATGGTCCGGAACCGACC
H2YKH8.opt_3PRIM GTGTAATGGATAGTGATCTTAGGTTTCCAGGAAACC
A0A081CL69.opt_5PRIM AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATTCTCGTCCGTCTCTGC
A0A081CL69.opt_3PRIM GTGTAATGGATAGTGATCTTATTCCAGGAAACCACGG
V4YNK0.opt_5PRIM AAAGAAGGAGATAGGATCATGCATCATCACCATCACCATATGAACAAACCGACCG
V4YNK0.opt_3PRIM GTGTAATGGATAGTGATCTTAAGAGTGAGACTGTTCCAGG
```

- Amorces avec Histag en 3'

```
W2JD21.opt_5 AAAGAAGGAGATAGGATCATGCTGGCGCGTCGTATC
W2JD21.opt_3his GTGTAATGGATAGTGATCTTAATGGTGATGGTGATGATGCAGAGAAGAGTAACGGTGTC
H2YKH8.opt_5 AAAGAAGGAGATAGGATCATGGGTCCGGAACCGACC
H2YKH8.opt_3his GTGTAATGGATAGTGATCTTAATGGTGATGGTGATGATGGGTTTCCAGGAAACC
A0A081CL69.opt_5 AAAGAAGGAGATAGGATCATGTCTCGTCCGTCTCTGC
A0A081CL69.opt_3his GTGTAATGGATAGTGATCTTAATGGTGATGGTGATGATGTTCCAGGAAACCACGG
V4YNK0.opt_5 AAAGAAGGAGATAGGATCATGATGAACAAACCGACCG
V4YNK0.opt_3his GTGTAATGGATAGTGATCTTAATGGTGATGGTGATGATGAGAGTGAGACTGTTCCAGG
```

L'amplification génique par PCR a été réalisée avec l'ADN de souches DSMZ et ATCC, à l'aide du kit d'amplification d'ADN Illustra GenomiPhi HY (GE Healthcare Life Sciences). Toutes les séquences ont été vérifiées. Lorsque des échantillons d'ADN correspondant au gène codant pour l'enzyme sélectionnée n'étaient pas disponibles, une PCR a été réalisée sur l'ADN d'une autre souche de la même espèce (cf. Set 1 de données supplémentaires de Bastard & Perret et al.⁶²), avec une séquence protéique identique. Chaque fois que metW a été identifié à proximité immédiate d'un metX sélectionné, il a été tenté de cloner le metX et le metW en une séquence polycistronique. Les gènes synthétiques ont aussi été clonés dans le pET22b modifié (+). Les séquences des plasmides résultants ont été vérifiées. Les programmes d'amplification des gènes d'intérêt par PCR pour le clonage LIC sont présentés dans les tableau 6 et tableau 7.

ADN	1 μ l	Cycles PCR : 95°C – 5min 95°C – 30s 55°C – 30s 72°C – 3min } x 30 cycles 72°C – 5min 10°C – ∞
Tampon 10x <i>Pfu</i>	3 μ l	
dNTP	0,5 μ l	
ADN polymérase <i>Pfu</i>	0,3 μ l	
H ₂ O	21,2 μ l	
1er oligonucléotide	2 μ l	
2ème oligonucléotide	2 μ l	

Tableau 6 : Préparation de la réaction de PCR pour les candidats non GC riches.

ADN	1 μ l	Cycles PCR : 95°C – 8min x 10 } 95°C – 30s 65°C → 55°C – 10min 72°C – 4min cycles x 20 } 95°C – 30s 52°C – 30s 72°C – 4min cycles 72°C – 5min 10°C – ∞
Tampon 10x <i>Pfu</i>	3 μ l	
dNTP	0,5 μ l	
ADN polymérase <i>Pfu</i>	0,3 μ l	
H ₂ O	17,2 μ l	
1er oligonucléotide	2 μ l	
2ème oligonucléotide	2 μ l	
Enhancer	4 μ l	

Tableau 7 : Préparation de la réaction de PCR pour les candidats GC riches. L'enhancer est composé de DMSO, DTT et de bétaine. Il permet de faciliter la dénaturation des ADN riches en GC.

Après purification des produits de PCR (via une plaque Multiscreen HTS PCR), l'insert est digéré comme suit : 40 μ L des produits de PCR sont mélangés à 5 μ L de Tampon2 (10X), 0,5 μ L de BSA (100X), 4 μ L de dGTP (5 mM), 0,5 μ L de T4 ADN polymérase (T4 pol., 3 U/ μ L). Le tout est placé à 37 °C pendant 20 min, puis 65 °C pendant 10 min, et enfin à 4 °C. Le tout est à nouveau purifié et repris dans du tampon TE (Tris + EDTA), puis 5 μ L des produits de PCR traités par la T4 pol. sont laissés en contact pendant 30 min à TA avec 0,3 μ L de vecteur (50 ng) déjà traité par la T4 pol. Pour hybridation. Finalement, des cellules compétentes Novablue d'*E. coli* (~20 μ L) sont transformées avec 7 μ L de plasmide recombiné selon le protocole décrit en 2.1.1.1.

2.2.2 Activités O-acyl-CoA transférases

- Détermination des activités L-sérine/L-homosérine acyl-CoA transférases

Les tests ont été réalisés dans 100 μL de tampon d'activité contenant du tampon Tris/HCl 50 mM pH 8, 5 mM de L-homosérine ou L-sérine, et 300 μM d'acyl-CoA (succinyl-CoA, acétyl-CoA). Les activités enzymatiques ont été mesurées en suivant la décroissance de l'absorbance à 232 nm liée à l'hydrolyse de la liaison thioester des acyl-CoA ($\Delta_{\text{EM}} = 4500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

- Paramètres cinétiques activité SAT/SST

Les activités spécifiques ont été déterminées dans 100 μL de tampon d'activité contenant un acide aminé à 5 mM (L-homosérine ou L-sérine) et 300 μM d'acyl-CoA (succinyl-CoA ou acétyl-CoA). Les constantes cinétiques de Cys2 (UniProt ID : Q10341) de *Schizosaccharomyces pombe* (Cys2_{pombe}), de Cys2-like_{campestris} (UniProt ID : Q8P8L2) et de Cys2-like_{frateuria} (UniProt ID : H8L374) ont été évaluées dans 100 μL de tampon d'activité contenant un acide aminé (L-homosérine ou L-sérine) et un acyl-CoA (succinyl-CoA ou acétyl-CoA). Pour les dosages, plusieurs concentration d'un substrat ont été testées tout en maintenant une concentration constante et saturante du second. La détermination des vitesses de réaction a été réalisée en surveillant la diminution de l'absorbance à 232 nm.

2.2.3 Synthèse chimique de l'O-succinyl-L-sérine (OSS)

Tous les réactifs ont été achetés auprès de sources commerciales et utilisés sans purification supplémentaire. Les spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker à 500 MHz de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (France) ou sur un spectromètre à 600 MHz de l'Université d'Evry Val d'Essonne (France). Les déplacements chimiques (exprimés en ppm) des spectres RMN ^1H et ^{13}C ont été rapportés aux pics de solvant $\delta(\text{H}) = 7,26$ et $\delta(\text{C}) = 77,3$ pour CDCl_3 et $\delta(\text{H}) = 4,79$ pour D_2O . La chromatographie sur colonne a été réalisée sur un CombiFlash Companion à l'aide de cartouches RF.

Pour la première étape de synthèse de l'OSS (synthèse de la *N*-Boc-O-succinyl-L-sérine), une solution de (tert-butoxycarbonyl)-L-sérine (9,75 mmol, 1 équivalent, 2,0 g), de pyridine séchée (500 μL) et de *N,N*-diméthylpyridin-4-amine (0,98 mmol, 0,1 équivalent, 119 mg) dans du dichlorométhane sec (100 mL) est mise sous agitation. Au goutte à goutte et sous atmosphère inerte, une solution d'anhydride succinique dans du tétrahydrofurane (THF) sec (14 mL) est ajoutée. Après 16h d'agitation à TA, le mélange réactionnel est concentré sous pression réduite jusqu'à un volume d'environ 15 ml et dilué avec de l'acétate d'éthyle (70 mL) et de l'eau (20 mL). Le pH est ajusté à 8,5 avec de l'hydrogénocarbonate de sodium saturé et la phase aqueuse est séparée et acidifiée à pH 3 avec une solution 2 N de HCl et extraite avec de l'acétate d'éthyle (4 x 30 ml). Les fractions organiques combinées sont ensuite séchées sur sulfate de magnésium, filtrées et concentrées à sec sous pression réduite. Le produit est ensuite purifié par chromatographie flash sur gel de silice (le gradient utilisé est le suivant : dichlorométhane avec 0,25% d'acide formique/méthanol avec 0,25% d'acide formique (99,5/0,5 à 90/10 en 10 min). La structure du produit obtenu (solides huileux) a été vérifiée par RMN (cf. annexe

4) et correspond bien à l'acide (S)-4-(2-((tert-butoxycarbonyl)amino)-2-carboxyéthoxy)-4-oxobutanoïque, soit la *N*-Boc-*O*-succinyl-L-sérine ; le rendement a été de 1,56 g (53%).

La seconde étape (déprotection de la *N*-Boc-*O*-succinyl-L-sérine et obtention de l'OSS) a été réalisée comme suit : 610 mg (1,99 mmol, 1 équivalent) de produit obtenu lors de la première étape sont remis en solution sous agitation dans du dichlorométhane sec (2 ml) et de l'acétate d'éthyle (2 ml) refroidi à 10 °C. Au goutte à goutte, 5 mL de HCl 2N (10 mmol, 5 équivalents) sont ajoutés. Après 6,5 heures à TA, le mélange réactionnel hétérogène est filtré et les solides lavés avec de l'acétate d'éthyle. L'OSS est ainsi obtenu pur sous la forme de solides blancs correspondant exactement à des chlorures d'OSS (structure vérifiée par RMN, cf. annexe 5). Le rendement a été de 366 mg (76%) et la masse exacte déterminée par HRMS mesurée à 204,05118 (m/z [M-H]⁺ théorique calculé pour C₇H₁₀NO₆ = 204,05136).

2.2.4 Activité cystéine synthase

Les réactions ont été réalisées en test couplé à l'aide de deux kits « acide succinique » et « acide acétique » de Megazyme, utilisant la pyruvate kinase (PK) et la lactate déshydrogénase (LDH) pour la détection des acides succinique et acétique. La détection de la synthèse de la L-cystéine à partir de l'*O*-succinyl-L-sérine et de l'*O*-acétyl-L-sérine s'est faite via la succinyl-CoA synthase et l'acétate kinase, respectivement. Les constantes cinétiques de Cys1a_{pombe} (Uniprot ID : O59701) de *S. pombe*, CysK_{campestris} (Uniprot ID : Q8P600) de *X. campestris*, CysK_{aurantia} (Uniprot ID : H8L2V2) de *F. aurantia* et CysK_{ADP1} (Uniprot ID : Q6FBQ5) d'*A. baylyi* ont été évalués en faisant varier la concentration d'un des substrats tout en maintenant constant une concentration saturante d'un autre. Les réactions ont été déclenchées avec 0,20 µg de Cys1a_{pombe}, ou 0,64 µg de CysK_{campestris}, ou 0,23 µg de CysK_{aurantia} dans un volume réactionnel de 100 µL (pH 8,4) contenant 20 µM de PLP. Le Na₂S a été préparé dans 10 mM de NaOH. Pour ADP1, 0,09 µg de CysK_{ADP1} a été ajouté pour déclencher la réaction sur Na₂S et OAS, et 0,43 µg pour déclencher la cinétique sur OSS. Toutes les réactions enzymatiques ont été réalisées à 25 °C à l'aide du spectrophotomètre à double faisceau SAFAS UVmc2. Tous les paramètres cinétiques ont été déterminés à partir de duplicas d'expériences via l'analyse non linéaire des vitesses initiales grâce au logiciel SigmaPlot version 9.0 (Systat Software).

2.2.5 Détection de l'*O*-succinyl-L-sérine

2.2.5.1 Préparation du Métabolome

Le métabolome de *X. campestris* (souche DSM3586) a été préparé selon le protocole de Stuanì et al.³⁷⁷, légèrement adapté. Brièvement, les cultures cellulaires en milieu liquide sont effectuées sous agitation (150 rpm) à 26°C jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ d'environ 1,4. Le milieu riche GYE (Glucose Yeast Extract) utilisé est composé de D(+)-Glucose anhydre 20 g.L⁻¹, d'extrait de levure 10 g.L⁻¹ et de carbonates de calcium (CaCO₃) 20 g.L⁻¹. Le milieu a été autoclavé et filtré à 0,22 µm. La culture saturée est ensuite diluée à une DO₆₀₀ de 0,05 dans un milieu milieu minimal inspiré du milieu « Vincent

Minimal Xanthomonas » décrit par Watt et al. et renommé VMX+. Le milieu VMX+ se compose de K_2HPO_4 1 g.L⁻¹, KH_2PO_4 1 g.L⁻¹, KNO_3 0,6 g.L⁻¹, D-(+)-Glucose anhydre 13,15 g.L⁻¹, D-(-)-Fructose 13,15 g.L⁻¹, NH_4Cl 1 g.L⁻¹ (solution A), $MgSO_4$ 2,5 g.L⁻¹, $CaCl_2$ 1 g.L⁻¹ (solution B), biotine 10 mg.mL⁻¹, panthothénate de calcium 10 mg. mL⁻¹, thiamine 10 mg.mL⁻¹ (solution C), et enfin $FeCl_3$ 0,2 g.mL⁻¹ (solution D). Les solutions A et B ont été autoclavées et la solution D filtrée à 0,22 μ m. Puis les solutions A, B, C et D ont été mélangées suivant le rapport 8/1/1/0,01 et la solution finale filtrée à 0,22 μ m. À $DO_{600} = 0,2$, 5 mL de cette culture sont filtrés à l'aide d'un filtre 47 mm PTFE (0,45 μ m) de Merck-Millipore. Le filtre est ensuite déposé sur gélose composée du même milieu, légèrement enrichie en extrait de levure (0,35 g.L⁻¹), cellules vers le haut. La culture en milieu solide est laissée jusqu'à une DO_{600} de 0,8 puis la croissance cellulaire est stoppée. Le métabolisme est ainsi figé en plaçant le filtre, cellules vers le bas, dans une coupelle contenant 5 mL d'un mélange acétonitrile/méthanol (80/20) à -30 °C ou solution de quenching. Après 15 min à cette température, le filtre est soumis à sonication dans un bain à ultrasons (Bronson 2510 Ultrasonic Cleaner) pendant 10 min à 4 °C afin de décoller le tapis cellulaire du filtre. Le liquide de quenching contenant les cellules est ensuite transféré dans un ou plusieurs vials cryogéniques et subit une série de 6 cycles de congélation/décongélation rapides permettant de casser les membranes cellulaires et d'extraire les métabolites, à l'aide d'azote liquide (-196 °C) et d'un bain marie à 65 °C. Puis les échantillons sont lyophilisés, repris dans 150 μ L d'eau et filtré à l'aide d'un filtre 0,22 μ m (Millipore Millex-GV, 13 mm). Le filtre est ensuite lavé avec 500 μ L d'un mélange acétonitrile/formate d'ammonium 10 mM (80/20) ; le pH a été ajusté à 6 avec de l'acide formique. Les échantillons sont ensuite analysés immédiatement après par LC-MS.

2.2.5.2 Analyse du métabolome

La détection des métabolites a été effectuée avec deux systèmes LC-MS utilisant le système LC Ultimate 3000 Rapid Separation (Thermo Scientific, San Jose, CA, États-Unis). La chromatographie liquide est couplée à un spectromètre de masse hybride Orbitrap Elite à très haute résolution (Thermo Scientific) ou à un spectromètre de masse hybride QTRAP 5500 (AB Sciex). Les deux spectromètres de masse sont équipés de sources d'ionisation électrospray (ESI) et fonctionnent en modes d'ionisation positive et négative.

Les séparations HPLC ont été effectuées sur colonne ZIC-pHILIC (100 x 2,1 mm, 5 μ m, Merck) thermostatée à 15 °C, avec un débit de 200 μ L.min⁻¹. La phase mobile A est constituée de formate d'ammonium 10 mM (pH 6,0), et la phase B d'acétonitrile. Le gradient utilisé est de 80 % de B pendant 2 min, suivi d'un gradient linéaire de 8 min descendant à 40 % de B, puis de 4 minutes supplémentaires à 40 % de B. Le système revient à sa composition initiale en 4 minutes et est rééquilibré dans ces conditions pendant 12 min. L'échantillonneur automatique a été maintenu à 4 °C et 3 μ L ont été injectés.

Pour les expériences menées sur l'Orbitrap, le pouvoir de résolution a été fixé à 60 000 M/M (avec une largeur complète à mi-hauteur à $m/z = 400$). Les spectres de masse ont été acquis sur une plage allant de $m/z = 50$ à $m/z = 1000$. Les débits de gaz de gaine et de gaz auxiliaire ont été réglés à 60 unités arbitraires (a.u.) et à 50 a.u., respectivement, et la température du gaz de séchage a été fixée à 275 °C. La tension de l'électrospray a été fixée à -4 kV en mode d'ionisation négative et à 4,2 kV en

mode positif. Les données brutes ont été analysées avec le navigateur Qual de Xcalibur version 2.2 (Thermo Scientific).

Les expériences menées sur le QTRAP ont été réalisées en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) avec les paramètres internes suivants : source d'ions, 5,5 kV en mode positif et -4,5 kV en mode négatif ; rideau gazeux, 20 a.u. ; température, 450 °C ; gaz 1, 45 a.u. ; gaz 2, 60 a.u. Les paramètres détaillés de la méthode et les transitions utilisées pour l'analyse des métabolites recherchés sont spécifiées dans le tableau 8. Trois transitions ont été enregistrées pour chaque composé. Les données ont été analysées avec le logiciel Analyst (AB Sciex).

Mode négatif	Q1 m/z	Q3 m/z	DP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
acétyl-L-sérine	145,9	59	-35	-14	-7
	145,9	118,9	-35	-14	-7
	145,9	65	-35	-34	-3
succinyl-L-sérine	204,0	103,9	-30	-15	-7
	204,0	117,1	-30	-20	-11
	204,0	185,9	-30	-10	-13
Mode positif	Q1 m/z	Q3 m/z	DP (Volts)	CE (Volts)	CXP (Volts)
acétyl-L-sérine	147,9	88,0	31	15	14
	147,9	106,0	31	15	18
	147,9	60,1	31	27	10
succinyl-L-sérine	206,0	88,1	21	19	17
	206,0	105,9	21	15	14
	206,0	101,0	21	25	16

Tableau 8 : Conditions MRM pour la détection de l'acétyl-L-sérine et de la succinyl-L-sérine. DP : potentiel de déclustering ; CE : énergie de collision ; CXP : potentiel en sortie de cellule de collision

2.2.6 Construction des mutants des MetX de *X. campestris* en vue d'intervertir les activités HST et SST

Les séquences *metX* (Uniprot ID : Q8P6V8) et *cys2-like* (Uniprot ID : Q8P8L2) de *X. campestris* ont été mutées afin de tenter d'intervertir leurs activités HST et SST respectives avec le kit de mutagenèse dirigée QuikChange XL d'Agilent Technologies.

La séquence MetX_{campestris} a été mutée (Y147M puis dans un second temps Y147A) avec les amorces suivantes :

Q8P6V8 Y147M-sens : GTTTTGTCGGTTATTCCATGGGCGCGCTGGTCGGCCTG

Q8P6V8 Y147M-antisens : CAGGCCGACCAGCGCGCCCATGGAATAACCGACAAAAC

Q8P6V8 Y147A-sens : GTTTTGTCGGTTATTCCGCAGGCGCGCTGGTCGGCCTG

Q8P6V8 Y147A-antisens : CAGGCCGACCAGCGCGCCTGCGGAATAACCGACAAAAC

Les protéines mutantes correspondantes ont été nommées MetX-HST2 Y147M et Y147A.

La séquence Cys2-like_{campestris} a été mutée (M150Y puis dans un second temps M150K) avec les amorces suivantes :

Q8P8L2 M150Y-sens : CCTGATCGGCAACTCGTACGGGGGCATGACCGCG

Q8P8L2 M150Y-antisens : CGCGGTCATGCCCCGTACGAGTTGCCGATCAGG

Q8P8L2 M150K-sens : CCTGATCGGCAACTCGAAGGGGGGCATGACCGCG

Q8P8L2 M150K-antisens : CGCGGTCATGCCCCCTTCGAGTTGCCGATCAGG

Les protéines mutantes correspondantes ont été nommées Cys2-like M150Y et M150K.

III Résultats et discussions

3.1 Projet SST

L'arbre de décision issu de l'analyse structurale des sites actifs des L-homosérine *O*-acyltransférases (MetX et MetA) et proposé pour l'annotation fonctionnelle de ces deux familles impliquées dans la voie de biosynthèse de la méthionine (Bastard & Perret et al., 2017), a permis la réannotation de plus de 60 % de l'ensemble de ces enzymes (cf. section 1.2.1). Comme nous l'avons vu, la superposition des prédictions d'activité via cet arbre sur le cladogramme taxonomique du NCBI a permis de mettre en évidence que l'activité L-homosérine *O*-acétyltransférase (HAT) est sans doute l'activité ancestrale des deux familles MetX et MetA, qui auraient divergé en parallèle récemment chez les protéobactéries vers l'activité L-homosérine *O*-succinyltransférases (HST), pour revenir indépendamment à une nouvelle convergence de fonction. Mon travail se focalise ici sur la famille MetX. Comme nous l'avons également déjà présenté en introduction, l'arbre de clustering hiérarchique des sites actifs des MetX (c.-à-d. de regroupement des protéines ayant des sites actifs similaires) est composé de 4 groupes structuraux distincts (cf. figure 14, section 1.2.1). Toutes les MetX codant pour une activité HAT (59 %) sont regroupées dans le même cluster G1 tandis que celles prédites comme ayant une activité HST (41 %) sont partagées en deux groupes : le groupe G2, contenant des MetX appelées MetX-HST1, et le groupe G3, plus petit, contenant les MetX-HST2. Une étude plus approfondie de la composition du groupe MetX-HST2 a montré qu'il était majoritairement composé d'enzymes eucaryotes (60 %), provenant plus particulièrement de fungi. Les procaryotes présents sont essentiellement des γ -protéobactéries (98 %) mais aussi quelques actinobactéries.

L'analyse fine de ce groupe a été entreprise par les auteurs de l'article au cours de ma première année de thèse, initialement focalisée sur ADP1. J'ai fait une parenthèse sur mon premier sujet pendant plusieurs mois afin de prendre en charge une grande partie de l'exploration expérimentale de cette sous-famille, notamment pendant la période contrainte de révision de l'article, et permettre ainsi d'inclure une partie de mon travail dans l'article dédié aux familles MetA et MetX. C'est en effet en s'intéressant aux enzymes de ce groupe, via une étude bibliographique et l'exploration expérimentale de l'activité de quelques MetX-HST2, que nous avons découvert une nouvelle famille d'enzymes impliquées non pas dans la biosynthèse de la méthionine mais dans celle de la cystéine, via un nouveau métabolite non décrit jusqu'à maintenant dans la littérature. La partie qui suit présente ainsi le cheminement qui a permis de dévoiler l'existence de cette nouvelle famille d'enzymes (paralogues aux MetX), leur caractérisation biochimique ainsi que la caractérisation de leur produit enzymatique.

3.1.1 Description détaillée du groupe ASMC MetX-G3

L'analyse ASMC de la famille MetX permet de mieux comprendre les capacités fonctionnelles de ces acyltransférases. Plus particulièrement, le groupe G3, qui regroupe les MetX utilisant le succinyl-CoA, se compose en réalité de 3 sous-groupes dont l'un est composé essentiellement (75 %) d'enzymes fongiques (groupe MetX-G3c). Or, chez les champignons l'acylation de l'homosérine dans la biosynthèse de la L-méthionine est catalysée par des L-homosérine *O*-acétyltransférases (HAT) codées par des gènes *metX*, communément nommées Met2 dans la littérature et relativement bien

étudiées^{392,393}. Les MetX-HAT de champignons se retrouvent en fait dans le groupe MetX-G1 qui regroupe les MetX-HAT procaryotes et eucaryotes. Des expériences de mutagenèse ont démontré chez le champignon filamenteux *Aspergillus nidulans*, que la délétion du gène *met2* entraîne une auxotrophie à la méthionine³⁹⁴. En fait, *A. nidulans* possède deux *metX*, l'un (Met2) dans le groupe MetX-G1, et un deuxième dans le groupe MetX-G3c, posant la question de son rôle physiologique car il ne semble pas compenser une mutation de *met2*.

En analysant globalement la répartition des MetX chez les champignons dont le génome complet est disponible, il a été noté qu'en réalité 67% d'entre eux possèdent deux gènes *metX* (figure 78) codant pour des enzymes réparties dans les deux groupes distincts MetX-G1 (HAT) et MetX-G3c (HST2).

Grynberg et ses collaborateurs ont identifié quant à eux chez *A. nidulans* un mutant d'un paralogue de *metX* qui induit une auxotrophie à la cystéine. La caractérisation de l'enzyme correspondante qu'ils ont nommé CysA a révélé qu'il s'agissait d'une enzyme dont l'activité était en réalité celle d'une L-sérine O-acétyltransférase (SAT)³⁹⁴. CysA est alors un nouveau type de SAT car non homologue aux SAT connues (CysE ou SprH) et, bien que catalysant la même réaction que les SAT, leurs origines évolutives sont indépendantes. On retrouve le gène *cysA* dans le groupe MetX-G3c.

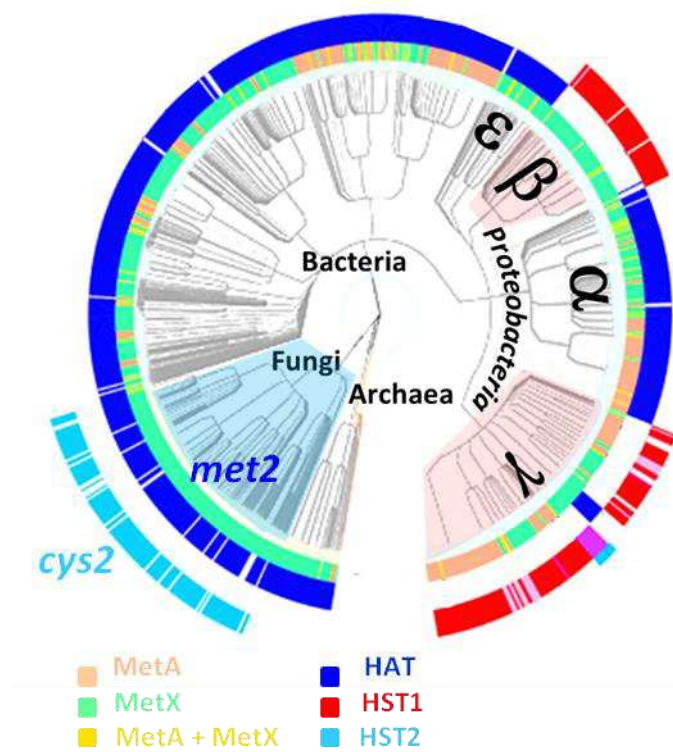


Figure 78 : Cladogramme taxonomique du NCBI et prédictions des activités des enzymes MetA et MetX

Dans deux autres études sur les champignons *Schizosaccharomyces pombe* et *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*), les auteurs décrivent de la même manière que les mutants de délétion de deux autres homologues de *metX* du groupe MetX-G3c développent une auxotrophie à la L-cystéine^{395,396}. Chez ces champignons, ces MetX-SAT ont été nommées Cys2 (équivalent de CysA chez

A. nidulans). Ces résultats expérimentaux semblaient donc indiquer que le groupe MetX-G3c serait composé de MetX impliquées dans la biosynthèse de la L-cystéine et pas dans celle de la L-méthionine.

Un élément nous a cependant intrigués : le criblage expérimental global effectué sur la centaine de MetX et MetA (cf. introduction) incluait quelques représentants procaryotes du groupe G3 (MetX des groupes G3a et G3c) et avait démontré l'utilisation du succinyl-CoA et non de l'acétyl-CoA pour l'acylation de la L-homosérine. Ainsi, en recoupant l'ensemble des informations issues de la littérature avec les résultats obtenus, il a été proposé que les enzymes fongiques Cys2 (groupe G3c) pourraient en fait constituer une classe nouvelle de L-sérine *O*-succinyltransférases (SST). Le corollaire étant alors la formation d'un métabolite jamais décrit jusqu'alors, l'*O*-succinyl-L-sérine (OSS), intermédiaire dans la voie de biosynthèse de la cystéine.

Mon implication dans le projet a commencé (un soir d'excitation dans le laboratoire) lorsque le soupçon sur cette activité potentielle de SST codée par des *metX* a été émis et que j'ai confirmé cette activité sous les regards impatients de Véronique et Alain Perret (biochimiste du LGBM qui a supervisé la partie biochimie du projet). Une partie de mon travail de thèse a donc consisté à mettre en évidence cette activité SST chez plusieurs enzymes MetX du groupe G3 et à caractériser ce nouveau métabolite OSS lors de réactions *in vitro*. Enfin, j'ai réalisé le métabolome d'un champignon afin de démontrer l'existence physiologique de l'OSS. Pour compléter la connaissance de cette voie chez cette levure, j'ai finalement cherché à déterminer si la cystéine synthase (CysK) catalysant l'étape suivante est capable d'utiliser l'OSS pour la synthèse de la cystéine via la voie de sulfhydrylation. J'ai ensuite étendu cette étude aux procaryotes de ce groupe.

3.1.2 Les MetX-HST2 fongiques (Cys2) sont-elles des SAT ou SST ?

Dans un premier temps, la détermination des activités spécifiques *O*-acyl-L-homosérine (HAT et HST) et *O*-acyl-L-sérine transférases (SAT et SST) des MetX-HST2 fongiques (Cys2) du sous-groupe MetX-G3c a été entreprise pour vérifier l'hypothèse émise (figure 79). Le but était de démontrer : d'une part l'existence inédite de l'activité SST pour ces enzymes, et d'autre part que cette activité n'est pas marginale comparée à leur activité SAT. Deux gènes de levures de l'embranchement des Ascomycètes, qui représentent 77 % des fungi du groupe MetC- G3c, ont donc été clonés pour étudier cette hypothèse. Les gènes correspondant aux Cys2 de deux champignons ascomycètes, *Schizosaccharomyces pombe* (Uniprot ID : Q10341) et *Aspergillus nidulans* (Uniprot ID : O13389), ont donc été clonés au laboratoire directement sur l'ADN des levures car ces gènes n'ont pas d'intron, et les protéines ont été surexprimées chez *E. coli* et purifiées sans difficulté.

Deux méthodes pour le suivi des réactions enzymatiques par spectrophotométrie ont été envisagées, car la méthode utilisée pour la mesure des activités HAT/HST lors du criblage global ne pouvait s'appliquer au suivi des activités SAT/SST. Soit la quantification à 410 nm des groupements thiols des CoA relargués lors de la réaction via le réactif d'Ellman (acide 5,5'-dithiobis 2-nitrobenzoïque ou DTNB), soit le suivi direct de la rupture de la liaison thioester des acyl-CoA à 232 nm. En effet, le criblage global des MetX et MetA n'ayant pas été réalisé avec l'une de ces deux méthodes mais grâce à un test quadricouplé comme nous l'avons vu, j'ai d'abord évalué ces deux méthodes alors utilisées pour d'autres projets au laboratoire. En 1999, Born et Blanchard ont remarqué que l'utilisation du DTNB pour quantifier les groupements thiols relargués lors de l'acylation de la L-homosérine peut

entraîner une inhibition des acyltransférases³⁹⁷ ; la seconde méthode a donc été privilégiée. Cette méthode, très sensible et générique, permet de mesurer les quatre activités (HAT, HST, SAT et SST) avec le même test en ne faisant varier que le substrat des MetX (L-homosérine ou L-sérine) et/ou l'acyl-CoA (acétyl-CoA ou succinyl-CoA). Elle présente néanmoins un inconvénient du fait de l'activité de ces enzymes : ayant constaté dans la mise au point du test que les MetX choisies étaient capables d'hydrolyser l'acyl-CoA en l'absence de substrat, cette activité résiduelle a été systématiquement estimée avant d'ajouter la L-sérine ou la L-homosérine.

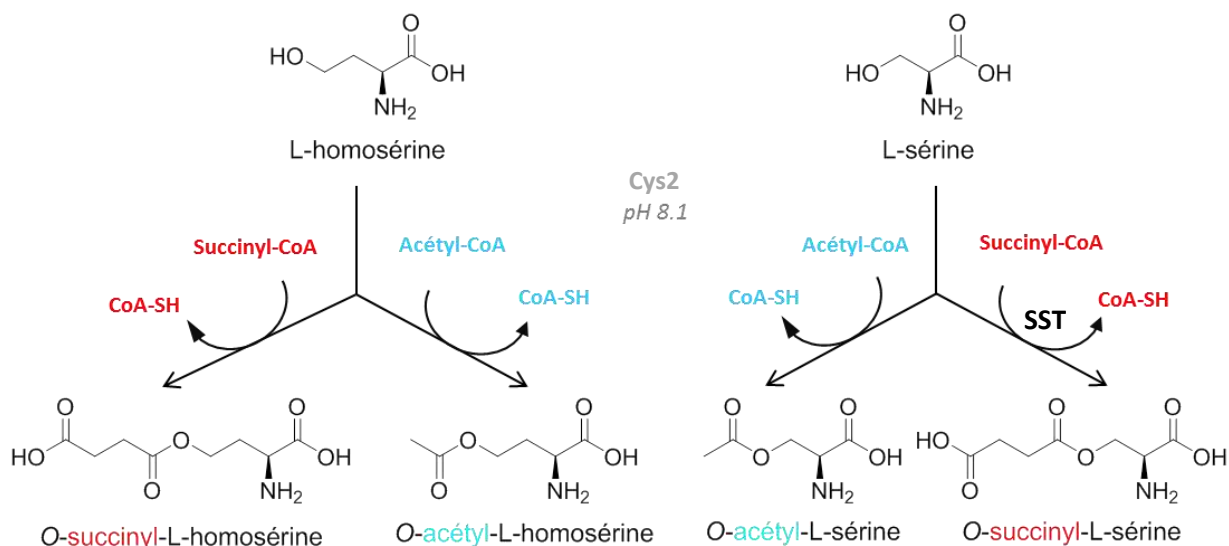


Figure 79 : Réactions d'acylation de la L-homosérine et de la L-sérine testées sur les deux enzymes fongiques Cys2.

L'étude des Cys2 fongiques a été réalisée conjointement et en parallèle avec Aline Mariage du laboratoire de Véronique car nous étions contraints par le temps de révision de l'article de Bastard et Perret et al., 2017. Pour la cohérence de l'étude présentée dans ce manuscrit, les résultats des paramètres cinétiques de Cys2_{pombe} déterminés par Aline sont également décrits pour compléter le reste de l'étude dont j'étais en charge. En effet, dans l'article d'origine soumis, cette nouvelle fonction des MetX n'avait été qu'évoquée au regard de mes résultats préliminaires. Pour des raisons de clarté du manuscrit je vais présenter les résultats acquis sur les organismes fongiques auxquels j'ai contribué pour moitié, puis ceux sur les procaryotes que j'ai individuellement obtenus. De même, pour alimenter la discussion et parce que dans la réalité du projet ce fut un aller-retour constant entre Karine Bastard en charge de la modélisation et de l'analyse structurale et nous, des parties de son travail qui éclairent nos résultats ont été intégrées dans ce manuscrit. Parce que ce fut un travail interdisciplinaire et pour qu'il n'y ait pas de confusion, je mentionnerai les personnes qui ont réalisé le travail quand ce n'est pas le mien. Seul le travail sur les enzymes fongiques et les résultats préliminaires obtenus sur une trentaine d'enzymes procaryotes ont été inclus dans l'article Bastard & Perret et al., 2017, dont je suis co-auteur. Le travail sur les procaryotes fait l'objet d'un autre article pour lequel aujourd'hui toutes les données ont été obtenues et qui est en préparation (Bessonnet et al., *en préparation*, 201x).

Les activités spécifiques O-acyl-transférases mesurées pour les deux Cys2 (Cys2_{pombe} et Cys2_{nidulans}) sont présentées dans le tableau 9. Les enzymes procaryotes de ce groupe ayant montré

expérimentalement une activité HST, nous avons d'abord voulu savoir si ces enzymes fongiques surexprimées dans *E. coli* étaient bien actives avant de tester leur capacité d'acylation de la L-sérine. Une activité HST de l'ordre de $\sim 100 \text{ nmole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ a pu être mesurée, en accord avec la prédiction d'activité de ces MetX-HST2 classées dans le groupe ASMC MetX-G3c. Aucune activité HAT n'a été mesurée en présence d'acétyl-CoA et de L-homosérine.

Ensuite, l'activité vis-à-vis de la L-sérine a été testée et une forte activité succinyl-transférase a pu être mesurée, de 1670 à 2850 $\text{nmole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ pour les Cys2_{nidulans} et Cys2_{pombe} respectivement. Une légère activité SAT a également été mesurée sur acétyl-CoA et sérine, comme cela avait été démontré pour CysA d'*A. nidulans*. Cependant cette activité SAT était d'une intensité faible, similaire à l'activité HST de chacune de ces enzymes (tableau 9), confirmant que les Cys2 ne sont sans doute pas des SAT mais des SST.

Groupe ASMC	Organisme	Identifiant Uniprot	Activité enzymatique ($\text{nmole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)				Taxonomie
			HAT	HST	SAT	SST	
G3c	<i>Aspergillus nidulans</i>	A0A1D3PCM3	0	105	72	1670	Eukaryota › Fungi › Dikarya › Ascomycota › Pezizomycotina
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Q10341	0	92	115	2850	Eukaryota › Fungi › Dikarya › Ascomycota › Taphrinomycotina

Tableau 9 : Activités spécifiques L-homosérine et L-sérine O-acyltransférases de Cys2 fongiques. Dosages effectués à 25 °C en présence de 5 mM de L-homosérine ou de L-sérine et de 300 μM d'acyl-CoA. Les valeurs mesurées à 232 nm correspondent à la moyenne de deux répliques. Publié dans Bastard & Perret et al., 2017.

Cette activité n'avait jamais été décrite dans la littérature jusqu'alors et constitue un argument supplémentaire à l'hypothèse émise précédemment : la succinylation de la L-sérine est probablement une réaction enzymatique impliquée dans la voie de sulfhydrylation pour la biosynthèse de L-cystéine chez les champignons. Cependant, si des MetX du groupe G3 sont des SST, succinylant préférentiellement la L-sérine plutôt que la L-homosérine, on peut également se demander si cette promiscuité de substrat jamais testée jusqu'alors est finalement partagée par l'ensemble de la famille MetX, et même, si la famille MetA, qui a convergé deux fois vers la même activité (HAT puis HST) au cours de son évolution avec les MetX, a également cette capacité.

3.1.3 L'acylation de la L-sérine est-elle répandue dans les familles MetX et MetA ?

Des représentants procaryotes de MetA ainsi que des MetX des autres groupes ASMC (G1 et G2, enzymes prédites comme HAT et HST respectivement) qui avaient été purifiés lors du criblage global ont été sélectionnés et testés pour les 4 activités. En tout, j'ai effectué près de 300 mesures d'activités HAT, HST, SAT et SST sur 35 enzymes avec la méthode spectrophotométrique à 232 nm utilisée pour les Cys2 du groupe MetX-G3. Les tests d'activité du criblage global HST/HAT ayant été faits différemment, les activités spécifiques HST et HAT pour chaque enzyme ont été réalisées dans ces

nouvelles conditions pour pouvoir être comparées aux activités SST et SAT éventuelles. L'ensemble des résultats est exposé dans le tableau 10.

Famille d'enzyme	Groupe ASMC	Organisme	Identifiant Uniprot	Activité enzymatique (nmole.min ⁻¹ .mg ⁻¹)			
				HAT	HST	SAT	SST
MetX	G1 (HAT)	<i>Haemophilus influenzae</i>	P45131	2,2·10 ⁴	0	0	0
		<i>Haloferax volcanii</i>	D4GY94	390	0	0	46
		<i>Haloferax gibbonsii</i>	M0HG00	56	0	-	-
		<i>Geobacter lovley</i>	B3E278	9,45·10 ⁵	20	0	0
		<i>Cyclobacterium marinum</i>	G0J5N4	2,04·10 ⁴	0	20	41
		<i>Methanosarcina acetivorans</i>	Q8TME4	4,85·10 ³	68	0	0
	G2 (HST1)	<i>Halomonas anticariensis</i>	S2L5R8	0	904	0	298
		<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1	Q6FEQ3	0	1,8·10 ³	0	199
		<i>Bordetella petri</i>	A9I0E6	0	183	0	85
		<i>Burkholderia thailandis</i>	Q2T284	0	3,05·10 ³	0	0
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P57714	0	1,05·10 ³	0	91
		<i>Comamonas testosteroni</i>	B7X2B6	0	3,05·10 ³	0	404
G3a (HST2)	<i>Xanthomonas campestris</i>	Q8P8L2	14	1,57·10 ³	9	4,4·10 ³	
G3b (HST2)	<i>Xanthomonas campestris</i>	Q8P6V8	0	2,0·10 ³	0	0	
G3c (HST2)	<i>Aspergillus nidulans</i>	A0A1D3PCM3	0	105	72	1,7·10 ³	
MetA	G1	<i>Bacillus clausii</i>	A0A1D3PDD4	3,12·10 ³	22	0	22
		<i>Ilyobacter polytropus</i>	E3HDJ8	3,55·10 ³	0	0	0
	G2 (P10=Ala) (P10=Ser)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	A0A1D3PCK2	3·10 ³	100	4,9·10 ³	0
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Q03V79	400	0	0	0
	G3	<i>Escherichia coli</i> K12	P07623	0	650	0	0
		<i>Shewanella baltica</i>	A6WLE9	0	420	0	0
	G4	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	A0A1D3PCI9	0	772	0	47
		<i>Thiothrix nivea</i>	I3BN39	0	10,1·10 ⁴	0	0
<i>Thiobacillus denitrificans</i>		Q3SM51	0	17,97 10 ³	0	0	

Tableau 10 : Activités spécifiques L-homosérine et L-sérine O-acyltransférases de MetX-HAT, MetX-HST1 et de MetA. Dosages effectués à 25 °C en présence de 5 mM de L-homosérine ou de L-sérine et de 300 µM d'acyl-CoA. Les valeurs correspondent à la moyenne de deux répliques.

D'un point de vue général, il n'est pas rare chez les MetX hors du groupe G3 que la L-sérine puisse être succinylée mais cette activité SST ne semble clairement pas leur activité principale (très grande différence d'activité spécifique entre leur activité HST et SST). Chez les MetX-HST, l'activité SST a été détectée pour 5 des 6 enzymes testées, mais à des niveaux relatifs très faibles, à l'exception des MetX de *Halomonas anticariensis* (33 % de l'activité HST) et de *Bordetella petri* pour laquelle l'activité mesurée s'est avérée faible aussi bien sur L-homosérine ($183 \text{ nmoles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) que sur L-sérine ($85 \text{ nmoles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$), contre 1.000 à 945.000 $\text{nmoles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ pour l'activité mesurée sur L-homosérine pour les autres MetX. Étrangement, alors que l'acétyl-CoA est utilisé par 6 MetX avec la L-homosérine, deux ont une faible activité SST : l'activité spécifique SST de l'archéobactérie *Haloferax volcanii* atteint 12 % de son activité HAT, qui est une des plus faibles activités HAT mesurées ($390 \text{ nmoles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) ; la seconde activité SST a été trouvée chez *Cyclobacterium marinum*, mais est extrêmement faible (0,2% de son activité HAT). Malgré tout, ces activités bien que très faibles sont significatives et mesurées de manière reproductible.

Il est à noter que les tests enzymatiques ont été réalisés à 25°C, ce qui ne correspond sans doute pas à des conditions optimales pour les enzymes issues d'organismes thermophiles comme les *Haloferax*, qui mériteraient une étude dédiée. Cependant, plus globalement, le rôle physiologique des MetX (appelés MetA1 dans les études de Gophna et al.⁶¹) dans la biosynthèse de la L-méthionine n'est à notre connaissance pas prouvé chez les archées, qui ont deux types de voies pour faire la synthèse de la L-méthionine : activation de l'homosérine via une homosérine kinase⁶¹ ou via une voie à partir l'aspartate semi-aldéhyde comme chez les méthanogènes¹⁴¹.

Chez les MetA, seules celles de *Bacillus clausii* et *Rhodopseudomonas palustris* ont, en plus de leurs activités HAT et HST respectives, une légère activité SST correspondant à 1 et 6% en valeur relative de leur activité principale. Par contre, MetA de *Lactobacillus acidophilus* présente une forte activité SAT ($4,9 \cdot 10^3 \text{ nmoles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) comparable à son activité HAT ($3 \cdot 10^3 \text{ nmoles.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$). Ce résultat renforce l'implication de paralogues de MetA dans la biosynthèse de la L-cystéine au moins chez *Lactobacillus* car en 2016, simultanément à nos premiers résultats, Bogicevic et ses collaborateurs ont publié des résultats similaires sur MetA de *Lactobacillus casei*³⁹⁸.

En résumé, bien que quelques enzymes MetX (nous ne parlerons pas des enzymes MetA, aux activités SST marginales et clairement SAT) aient une certaine promiscuité de substrat en ce qui concerne la prise en charge de l'acide aminé à acyler, cette activité promiscuitaire reste à un niveau vraisemblablement accessoire. Les enzymes fongiques Cys2 appartenant au groupe MetX-G3c semblent ainsi être un cas à part de MetX impliquées dans la biosynthèse d'O-succinyl-L-sérine. Il a donc semblé crucial d'apporter une preuve directe de la formation d'OSS observée indirectement par spectrophotométrie, via la caractérisation spectroscopique du produit enzymatique. De plus, la détermination des paramètres cinétiques d'une Cys2 a également permis, comme nous allons le voir, de nous aiguiller quant à la recherche du métabolite OSS *in vivo* chez un des deux champignons.

3.1.4 Caractérisation de la L-sérine O-succinyltransférase de *Schizosaccharomyces pombe* et de son produit enzymatique

3.1.4.1 Synthèse chimique du standard O-succinyl-L-sérine (OSS)

Les activités SST ayant été mesurées indirectement via la coupure de la liaison thioester du succinyl-CoA à 232 nm, nous avons entrepris d'identifier directement le composé formé afin de prouver la formation d'O-succinyl-L-sérine (OSS) *in vitro* par Cys2_{pombe} en présence de succinyl-CoA et de L-sérine, en utilisant la spectrométrie de masse. Cependant, l'OSS n'étant pas un produit commercial, nous avons dû le synthétiser chimiquement afin d'obtenir un standard valable. Du fait de mon double cursus chimie-biologie en master, on m'a proposé de réaliser la synthèse guidée par Carine Vergne du Laboratoire de Chimie Organique et Biocatalyse (LCOB) du Genoscope. Nous avons donc produit l'OSS en deux étapes :

- la 1^{ère} étape a consisté à succinylet régiosélectivement la L-sérine au niveau de sa fonction alcool sous atmosphère inerte ; pour cela, nous avons utilisé la boc-L-sérine, un composé commercial portant un groupement protecteur N-tert-butoxycarbonyl (Boc) sur sa fonction amine (figure 80). La N-boc-O-succinylsérine formée a ensuite été isolée par extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle et purifiée par chromatographie flash. Sa structure a alors été vérifiée par une analyse intermédiaire utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN - annexe 4).

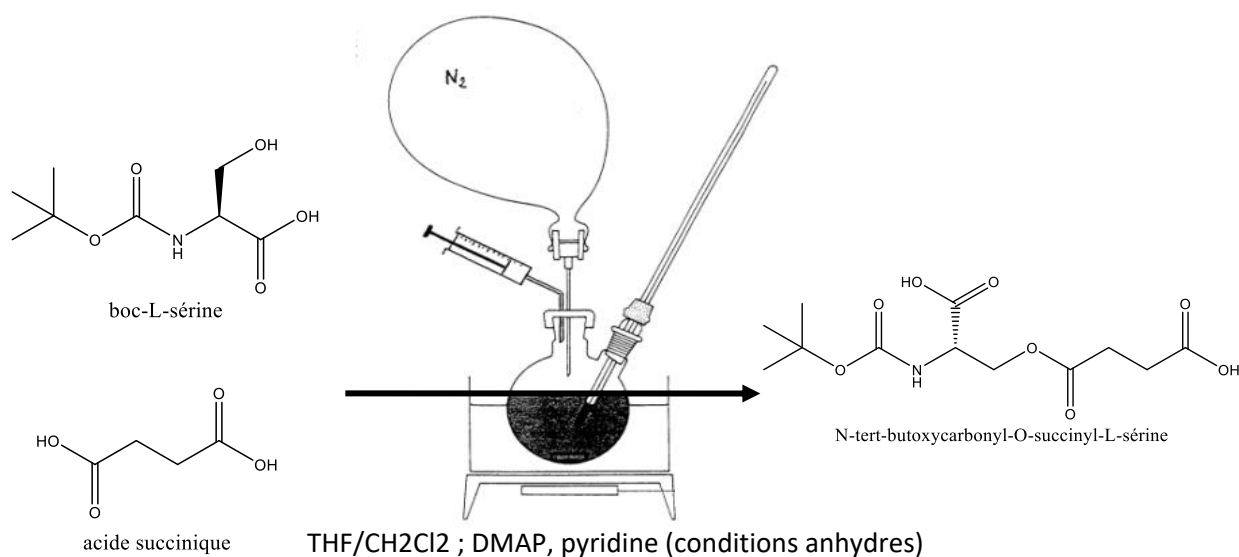


Figure 80 : Réaction d'O-succinylation de la boc-L-sérine. L'acide succinique a été utilisé sous sa forme anhydride.

- la 2^{nde} étape a quant à elle permis de déprotéger complètement la N-boc-O-succinylsérine par hydrolyse acide afin de ne récupérer que l'O-succinyl-L-sérine. Lors de cette hydrolyse (figure 81), le groupement Boc se dégrade en cation tert-butyl et en CO₂ par prototropie, le chlorure de tert-butyle étant ensuite neutralisé en isobutylène, gaz également facilement éliminable. Une ultime analyse RMN a été effectuée par Carine à l'UEVE afin de vérifier la structure du standard synthétisé (annexe 5).

Une fois la structure du standard OSS validée par RMN, celui-ci a pu être injecté en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS) en vue d'une comparaison avec le produit enzymatique formé par Cys2 lors d'une réaction SST.

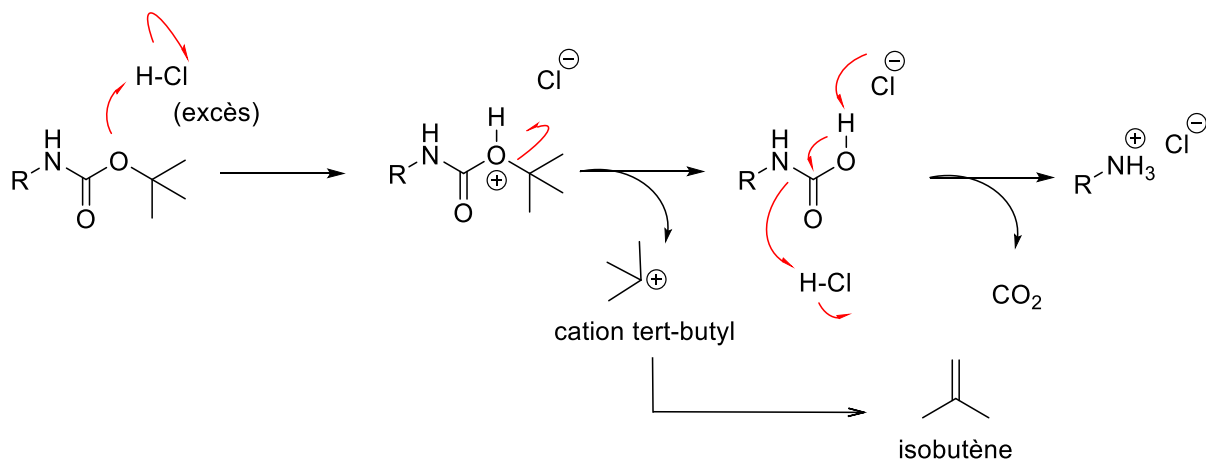


Figure 81 : Mécanisme de déprotection de la N-boc-O-succinylsérine. $R-NH_3 = O$ -succinyl-L-sérine.

3.1.4.2 Validation *in vitro* de la formation du nouveau métabolite OSS

Cys2_{pombe} a été mise en présence de L-sérine et de succinyl-CoA pendant 15 min et le produit de la réaction a été analysé en LCMS LTQ-Orbitrap Elite™ dans le laboratoire de Marcel Salanoubat (LGBM). Les réactions ont été injectées par Pascal Bazire du Laboratoire de Génomique et Biochimie du Métabolisme (LGBM) mais j'ai pu rapidement être autonome sur l'analyse des chromatogrammes.

Tout d'abord, une solution contenant le standard chimique OSS a été injectée sur une colonne ZIC®-pHILIC polaire pour servir de témoin. L'analyse a été réalisée en mode positif en recherchant la masse exacte de 206,0659 g.mol⁻¹, correspondant à l'ion moléculaire formé par la protonation de l'OSS. Ensuite, la caractérisation du produit de la réaction enzymatique formé s'est faite par injection du milieu réactionnel filtré. Alors que nous nous attendions à obtenir un unique pic à un temps de rétention correspondant à celui obtenu lors de l'injection du standard OSS chimique, à 7,33 min, deux pics sont apparus pour la même masse : le premier à 7,33 min, comme l'OSS standard, et un second à 8,31 min (figure 82). Par ailleurs ce même pic à 8,31 min a également été détecté suite à l'injection d'un témoin négatif sans Cys2, contenant seulement de la L-sérine, le succinyl-CoA et le tampon Tris/HCl pH 8,1.

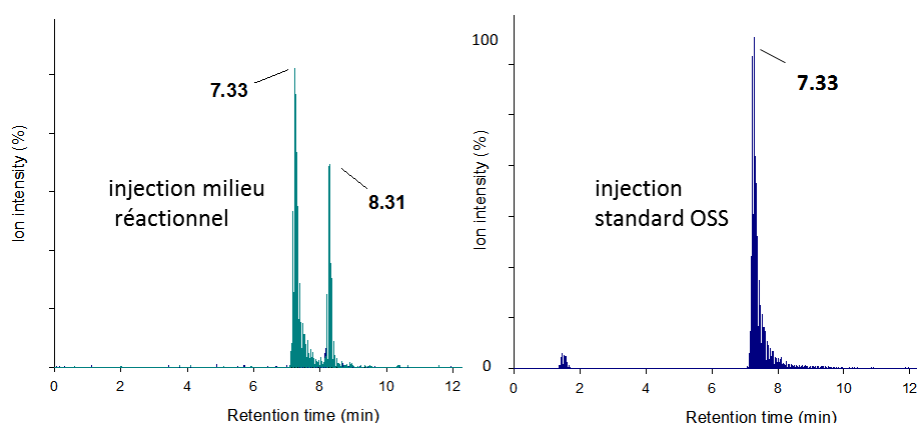


Figure 82 : Chromatogrammes LC-MS du produit de la réaction SST réalisée par Cys2_{pombe} et du standard OSS. Le milieu réactionnel comportait l'enzyme Cys2_{pombe}, du succinyl-CoA, de la L-sérine et le tampon Tris/HCl pH 8,1. L'analyse a été faite en mode positif via l'appareil LTQ-Orbitrap Elite™. Chromatogrammes obtenus pour la détection de l'ion moléculaire OSS [M+H⁺] avec le rapport m/z= 206,0659.

La détection de deux composés de masses moléculaires identiques mais avec des temps de rétention bien distincts laissait penser qu'un isomère d'OSS était produit lors de la réaction SST catalysée par Cys2. Il s'avère que le phénomène d'isomérisation d'acides aminés *O*-acylés a été étudié dès les années 1960s : en 1965, Flavin et Slaughter ont montré qu'à pH 7,5 un réarrangement spontané de l'*O*-succinylhomosérine (OSH) avait lieu et se traduisait par le transfert de l'acyle depuis l'oxygène de l'homosérine vers l'azote de son groupement amine, formant alors la *N*-succinylhomosérine (NSH)³⁹⁹ ; les auteurs ont ainsi estimé qu'après 72h à 45°C, 64% des produits de décomposition de l'OSH sont constitués de NSH (le tiers restant étant des produits d'hydrolyse), tandis qu'en conditions acides aucun transfert d'acyle N→O n'est observé avec la NSH, celle-ci ayant plutôt tendance à s'isomériser en *N*-succinylhomosérine lactone. L'année suivante, Kredich et Tomkins ont pu mettre en évidence le même phénomène d'isomérisation sur l'*O*-acétyl-L-sérine (OAS - figure 83A) : ils ont réalisé l'acétylation enzymatique de sérine radiomarquée à deux pH différents, 7,1 et 8, et ont déposé des quantités égales des produits de réaction à différents temps sur CCM pour en réaliser l'autoradiographie. Ils ont ainsi pu montrer qu'à pH neutre, très peu de *N*-acétyl-L-sérine (NAS) se formait et que son apparition ne se faisait qu'après 10 min de réaction, alors qu'à pH 8 il y avait vraisemblablement plus de NAS formé après 3 min de réaction qu'au bout de 10 min à pH 7⁴⁰⁰. L'hypothèse a donc été émise que le même mécanisme entrainait en jeu pour l'OSS formé à pH 8,1 dans nos conditions de réactions enzymatiques (figure 83B).

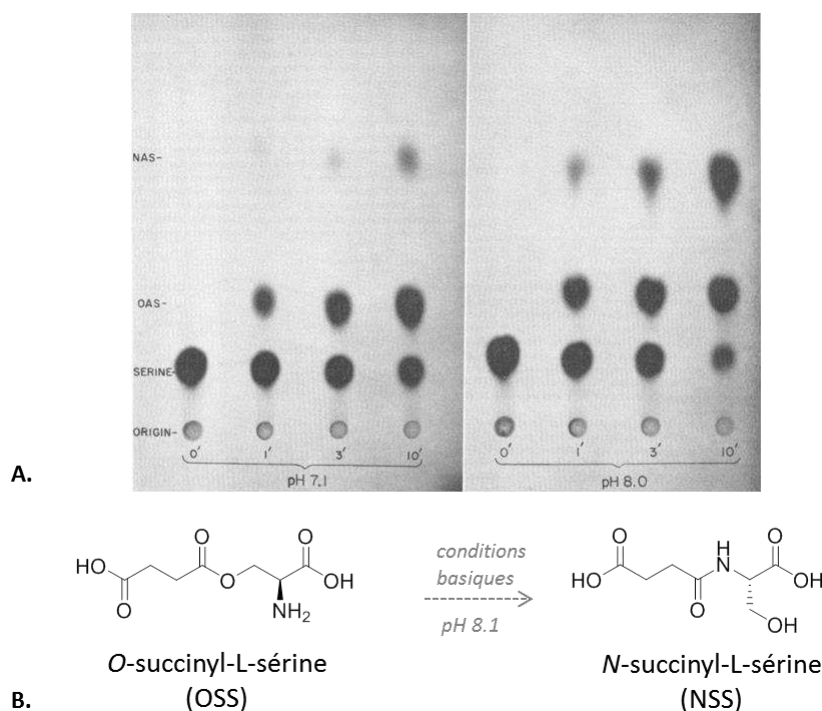


Figure 83 : Illustration du phénomène d'isomérisation de l'*O*-acétyl-L-sérine à pH basique.
A. Suivi CCM (révélation par autoradiographie) de 2 réactions enzymatiques catalysées par une SAT en présence de sérine marquée au ^{14}C et d'acétyl-CoA. À gauche, milieu réactionnel à pH 7,1 ; à droite, pH 8. **B.** Réaction supposée d'isomérisation de l'*O*-succinyl-L-sérine (OSS) à pH basique en *N*-succinyl-L-sérine (NSS). (Issu de Kredich et Tomkins, 1966).

L'absence d'observation de l'isomère NSS lors de l'injection du standard OSS s'explique facilement par l'environnement relativement acide des conditions d'injection et d'analyse, le pH de la phase aqueuse de la phase mobile utilisée ici en LC-MS étant égal à 6. L'isomère NSS n'étant pas non plus disponible commercialement, celui-ci a été synthétisé par Carine en suivant le protocole publié par Sakai et al.⁴⁰¹ Le NSS a donc été injecté avec la même méthode et les mêmes conditions que l'OSS chimique ; pour un rapport m/z de 206,0659, un seul pic est apparu sur le chromatogramme avec un temps de rétention (TR) de 8,31 min (figure 84A), semblable donc à celui obtenu pour le second pic du chromatogramme de la réaction enzymatique (TR = 8,31 min). Les profils de fragmentation MS^2 obtenus en ciblant l'ion moléculaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à $m/z = 206,0659$ ont confirmé ces résultats (figure 84) : en effet les profils de fragmentation du composé présent dans le pic à 7,33 min et celui du standard OSS se sont avérés identiques, confirmant ainsi qu'il s'agit bien de l'OSS enzymatique. Enfin, les données de fragmentation MS^2 du standard NSS (TR = 8,31 min) se sont révélées identiques au NSS produit spontanément non enzymatiquement.

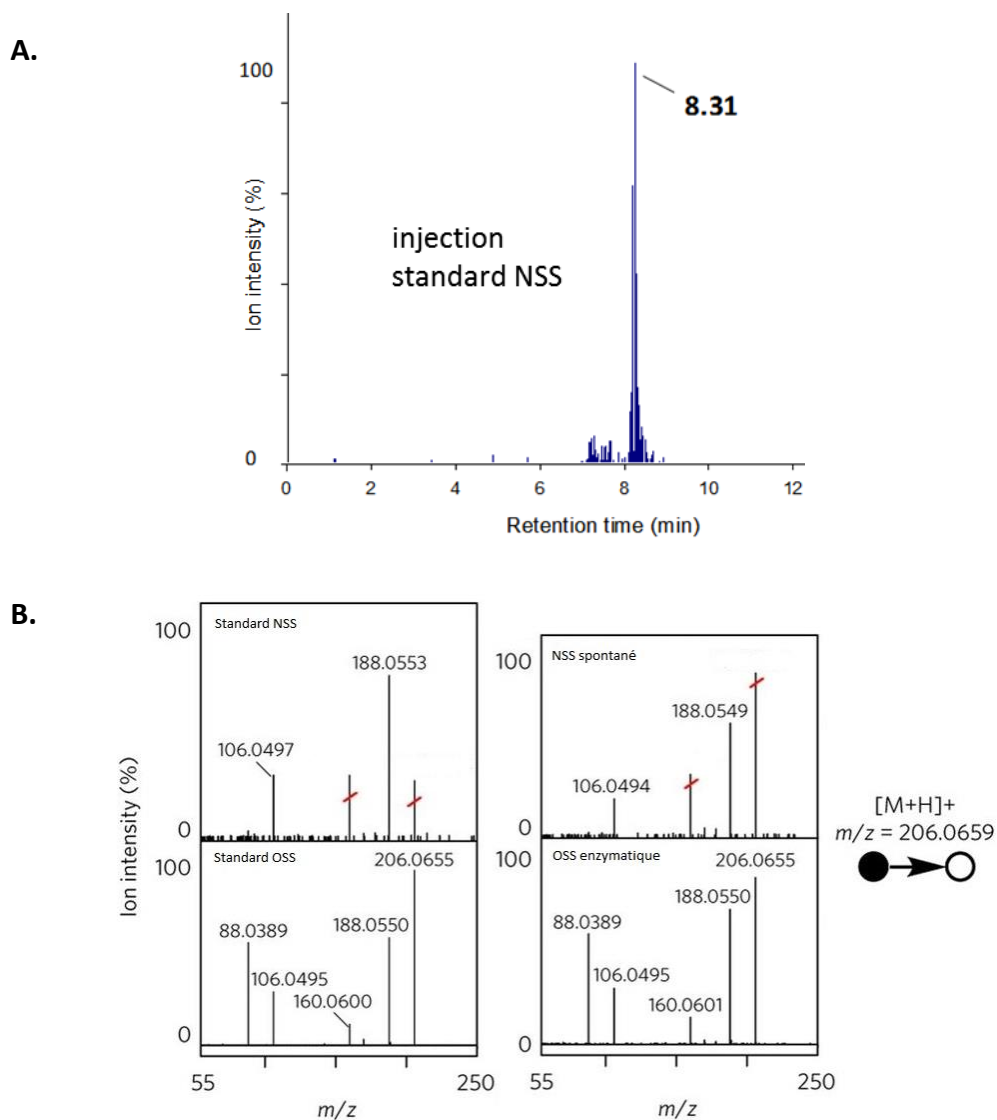


Figure 84 : Mise en évidence de la production d'OSS par Cys2_{pombe}. L'analyse a été faite en mode positif via l'appareil Orbitrap Elite™. Chromatogrammes obtenus pour la détection de l'ion moléculaire OSS $[M+H]^+$ au rapport $m/z = 206,0659$. **A.** Chromatogramme du standard synthétisé *N*-succinyl-L-sérine (NSS). **B.** Spectres de fragmentation MS² de l'ion moléculaire $[M+H]^+$ ($m/z = 206,0659$) pour les standards NSS, OSS, le NSS formé spontanément, et l'OSS enzymatique.

L'identification de l'OSS par spectrométrie de masse nous a ainsi apporté la preuve directe que Cys2_{pombe} est bien une SST et qu'elle catalyse la formation d'OSS, celui-ci pouvant s'isomériser en NSS en conditions basiques. Par conséquent, nous avons par la suite entrepris de déterminer les paramètres cinétiques de Cys2_{pombe}, afin de mieux évaluer s'ils sont compatibles avec un rôle physiologique⁴⁰² dans le métabolisme de *S. pombe*.

3.1.4.3 Paramètres cinétiques de Cys2 de *S. pombe*

Selon l'hypothèse émise, l'enzyme Cys2_{pombe} aurait une efficacité catalytique plus élevée avec la L-sérine sur succinyl-CoA qu'en présence de L-homosérine. Nous avons donc caractérisé Cys2_{pombe} sur succinyl-CoA en présence de L-homosérine et de L-sérine, via le test spectrophotométrique permettant de suivre à 232 nm la rupture du pont thioester de l'acyl-CoA (tableau 11).

Son efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) s'est avéré plus de 300 fois supérieure avec la L-sérine qu'avec la L-homosérine ($6,2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ contre $19 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, tableau 11) ; de plus le K_m de Cys2_{pombe} pour la L-sérine est ~600 fois moins élevé que sur L-homosérine (1,2 mM contre 738 mM), confirmant que Cys2_{pombe} réalise préférentiellement l'acylation de la L-sérine à celle de la L-homosérine. Par ailleurs à concentration égale de L-sérine, les K_m obtenus pour le succinyl-CoA et l'acétyl-CoA sont assez similaires, tandis que l'efficacité catalytique, 100 fois moindre sur acétyl-CoA, reste à l'avantage de la succinylation de la L-sérine. L'ensemble des paramètres cinétiques mesurés pour Cys2_{pombe} suggère par conséquent que la formation d'*O*-succinyl-L-sérine dans la cellule serait favorisée.

Substrat	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ · M ⁻¹)
L-serine ¹	7.4 ± 1.5	1.2 ± 0.1	6.2 10 ³
succinyl-CoA ²		0.025 ± 0.005	3.0 10 ⁵
acetyl-CoA ²	0.2 ± 0.01	0.045 ± 0.008	4.4 10 ³
L-homoserine ¹	13.8 ± 2.1	738 ± 44	19

⁽¹⁾ Concentration fixe succinyl-CoA = 500 μM

⁽²⁾ Concentration fixe L-sérine = 6 mM

Tableau 11 : Paramètres cinétiques de Cys2 de *Schizosaccharomyces pombe*. Chaque valeur correspond à la moyenne de deux répliques.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons donc décidé de rechercher la présence d'OSS *in vivo* dans un métabolome de *S. pombe*. Il est à noter qu'aucun homologue à une SAT classique (CysE ou SrpH) n'ayant été identifié dans le génome de *S. pombe*, nous ne nous attendions pas en théorie à trouver de l'*O*-acétyl-L-sérine (OAS). L'absence de SAT pourrait par ailleurs être en accord avec ce qui est décrit pour la biosynthèse de la L-cystéine par transsulfuration réverse chez la plupart des levures³⁹⁶ (extrapolé à partir de l'organisme *Saccharomyces cerevisiae*, modèle des levures pour le métabolisme du soufre), mais cette voie réverse s'avère justement absente chez *S. pombe*⁴⁰³.

3.1.4.4 L'OSS, un métabolite inédit impliqué dans la biosynthèse de la L-cystéine : validation *in vivo* chez *S. pombe*

Pour prouver l'existence *in vivo* de ce nouveau métabolite qu'est l'OSS, l'étude du métabolome, c.-à-d. de l'ensemble des molécules organiques d'une cellule formées à partir de son métabolisme ou qui y participent, a été entreprise chez *S. pombe* avec l'aide du LGBM. Un projet dédié à l'étude du métabolisme d'ADP1 et mené par Alain Perret (LGBM) utilise en effet un protocole

d'extraction de métabolites optimisé pour cette bactérie, mais aucun métabolome eucaryote n'avait été étudié au laboratoire. Afin de mener à bien cette étude métabolomique visant à mettre en évidence la présence de l'OSS chez *S. pombe*, une phase de développement a donc été nécessaire afin d'adapter le protocole de culture et d'extraction à *S. pombe*. J'ai donc été formé au protocole initial par Pascal Bazire qui m'a supervisé le temps d'être autonome.

La première étape a été de trouver de bonnes conditions de culture pour cette levure, en sachant qu'au laboratoire nous ne travaillons usuellement qu'avec des procaryotes. Le milieu minimum choisi pour cette culture est le milieu commercial EMM (Edinburgh Minimal Medium), spécialement adapté pour la culture de *S. pombe*. Les précultures et cultures de la souche *S. pombe* DSM 70576 ont été réalisées en milieu minimum (avec sulfate comme source de S) afin de limiter les apports en acides aminés comme la cystéine qui, si elle est présente dans le milieu, peut limiter la biosynthèse des intermédiaires présents en amont de la voie de biosynthèse de la L-cystéine. *S. pombe* est d'abord cultivé en milieu solide EMM puis ensemencé dans une préculture liquide du même milieu. Un aliquot de cette préculture est ensuite prélevé afin d'ensemencer une culture liquide EMM avec une densité optique (DO) initiale de 0,05 puis *S. pombe* est laissée en culture jusqu'à DO ~0,2 (figure 85). Des volumes égaux de culture sont alors prélevés et filtrés. La culture sur filtre permettra par la suite de faciliter les manipulations pour avoir un arrêt de croissance de ces cellules en les figeant rapidement sans induire de stress. Les filtres sont placés sur boîtes EMM afin de les laisser atteindre la phase exponentielle de croissance. La DO est suivie grâce à des filtres dédiés et inoculés en parallèle des filtres destinés à l'extraction. À DO = 0,8, correspondant à au moins deux temps de génération, la croissance des cellules est stoppée brutalement (étape de « quenching ») en plongeant le plus vite possible le filtre dans un mélange acétonitrile/méthanol sur carboglace, étape cruciale qui permet de figer le métabolisme entier et d'éviter les « fuites » de métabolites si certaines réactions avaient été incomplètement stoppées. Les cellules sont ensuite détachées du filtre et placées dans un tube afin d'être lysées pour en extraire le métabolome. Les métabolites extraits (via plusieurs cycles de congélation/décongélation dans de l'azote liquide à -196°C et bain-marie à 65°C) sont ensuite séchés puis repris dans un mélange eau/phase mobile adapté à la méthode utilisée pour l'analyse LC-MS ; les déchets cellulaires sont éliminés par filtration et les échantillons sont finalement analysés par spectrométrie de masse.

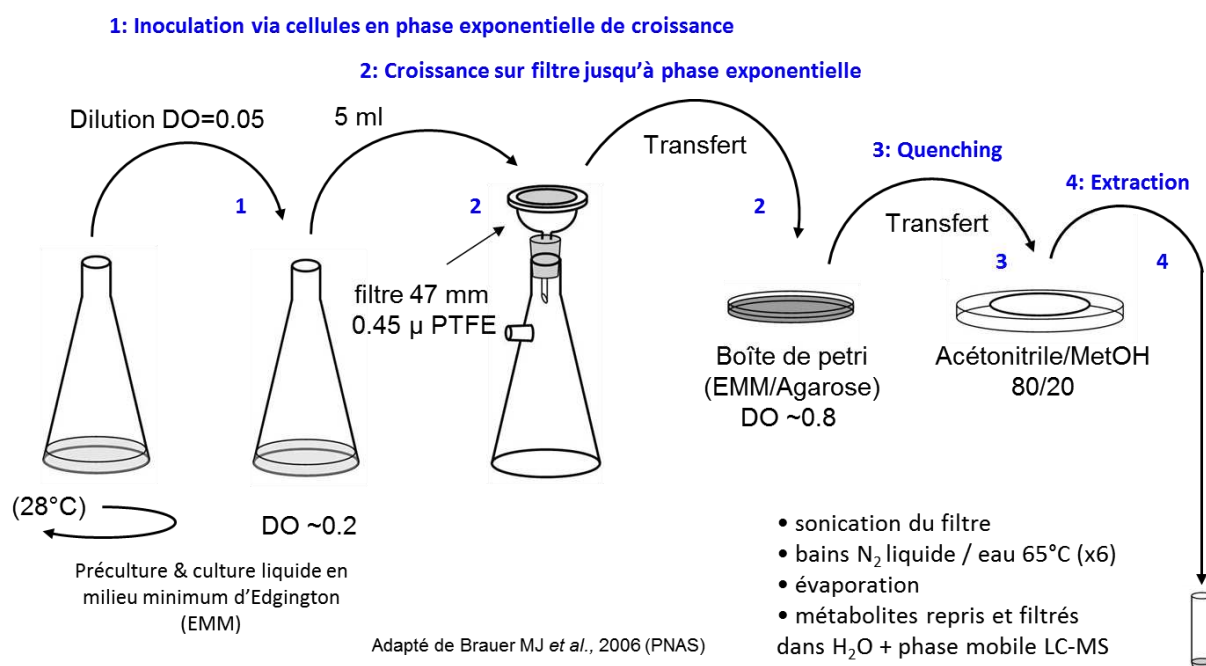


Figure 85 : Description du protocole de culture et d'extraction du métabolome de *S. pombe*. Adapté de celui mis au point pour ADP1 par Stuani *et al.*, 2014.

La détection de l'OSS a été réalisée par LC-MS à l'aide du spectromètre de masse QTRAP® 5500 d'AB SCIEX, à l'aide du mode Multiple Reaction Monitoring (MRM), méthode développée par Ekaterina Darii (LGBM). Les résultats ont été analysés en premier lieu par Ekaterina. Le système LC-MS Qtrap permet de gagner en sensibilité lors de la détection de composés cibles dans un milieu complexe, ici l'OSS dans le métabolome ; le mode MRM permet de sélectionner un ion parent, de le fragmenter et de sélectionner par la suite un ou plusieurs ions fils, ce qui rend la détection du composé recherché extrêmement spécifique. Comme témoins, nous avons utilisé les métabolites synthétisés auparavant (OSS et NSS) qui ont été préparés dans un tampon et injectés mais après avoir subit le même protocole d'extraction complet pour mimer les conditions physiologiques. Nous avons également injecté comme témoin l'OAS pour essayer d'en détecter la présence dans le métabolome. L'étude des transitions énergétiques entre paires d'ions père-fils nous a ainsi permis d'identifier l'OSS dans le métabolome de *S. pombe* (en triplicat biologique), en faible quantité mais avec un signal clair (deux transitions ont été suivies) et distinct (figure 86). Par contre, dans nos conditions nous n'avons pas identifié d'OAS dans ces métabolomes en accord avec l'absence de SAT et de la faible efficacité catalytique de Cys2_{pombe} pour produire de l'OAS. Pour compléter la démonstration, nous avons commandé le mutant Δ cys2_{pombe} (KP2990 ; h- leu1-32 cys2-1)⁴⁰⁴ décrit comme auxotrophe à la cystéine par Ma et ses collaborateurs en 2007⁴⁰⁴ et qui est distribué par la collection japonaise YGRC/NBRP (ID : FY17212). Le métabolome de Δ cys2_{pombe} a également été préparé dans les mêmes conditions mais supplémenté en L-cystéine et nous n'avons pu identifier d'OSS comme cela était attendu après délétion du gène codant pour la SST. Il reste néanmoins possible que l'apport en cystéine pour compléter le milieu en source de S ait pu atténuer la production de substrat nécessaire à sa synthèse.

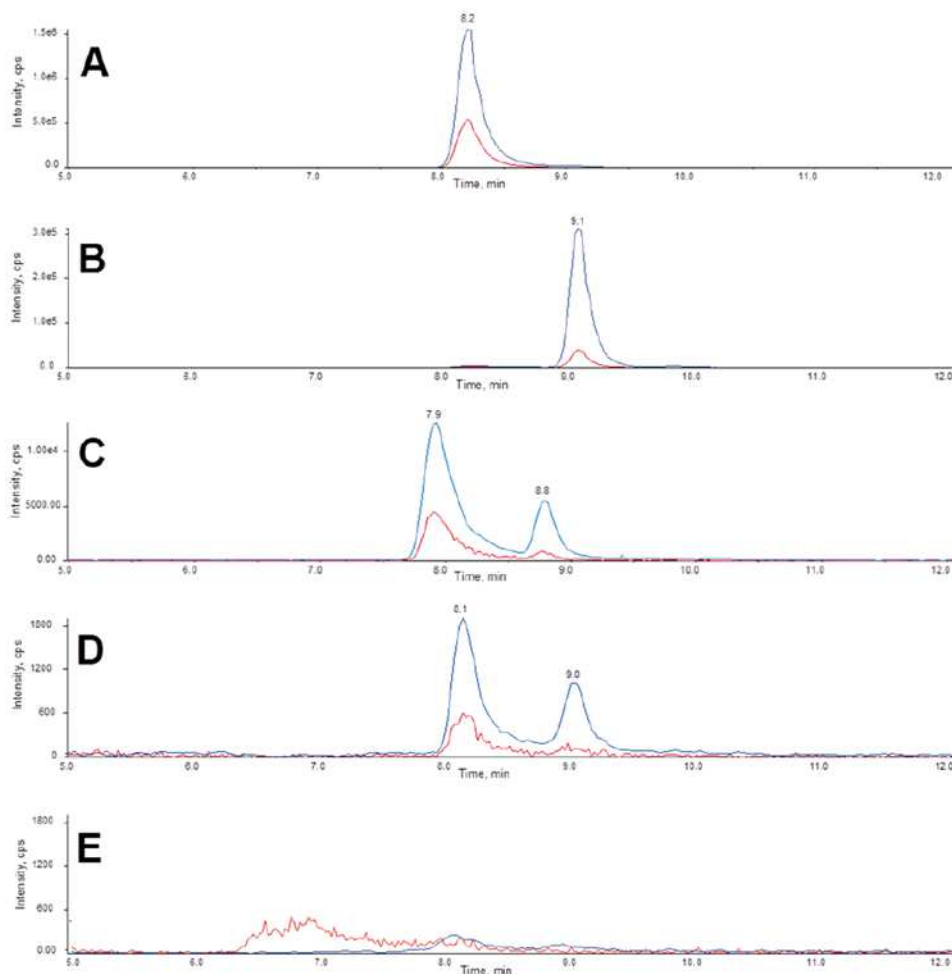


Figure 86 : Détection de l’O-succinyl-L-sérine dans le métabolome de *S. pombe*. La recherche d’OSS, OAS et de NSS a été effectuée par LC-MS sur QTRAP® 5500 en utilisant le mode MRM. Les chromatogrammes des ions extraits (XIC) présentés représentent les transitions de deux paires d’ions : en bleu, 204 → 103,9 ; en rouge 204 → 117,1. **A.** Standard de référence OSS. **B.** Standard de référence NSS. **C.** Standard OSS ajouté à des cellules *S. pombe* après lyse cellulaire afin d’évaluer la conversion spontanée d’OSS en NSS pendant la préparation et l’analyse de l’échantillon. **D.** Métabolome extrait de cellules *S. pombe* (un seul des réplicas est montré ici). **E.** Métabolome du mutant $\Delta cys2_{pombe}$. La présence d’OAS a également été étudiée dans le métabolome *S. pombe*, mais n’a pas pu être établie. L’ensemble de ces analyses LC/MS ont été effectuées en mode d’ionisation négative.

Les données métabolomiques corroborent donc les données biochimiques obtenues précédemment sur l’activité de $Cys2_{pombe}$. Elles ont ainsi permis de mettre en évidence la biosynthèse d’OSS *in vivo* chez *S. pombe* ; de plus, l’absence de détection d’OAS dans le métabolome de *S. pombe* et la comparaison des paramètres cinétiques sur acétyl-CoA et succinyl-CoA en utilisant la L-sérine comme accepteur d’acyle laissent tous deux penser que la production d’OSS par $Cys2_{pombe}$ sert bien *in vivo* à la biosynthèse de la L-cystéine. L’ensemble de ces résultats expérimentaux a été intégré à l’article Bastard et al., dans la version définitive de l’article.

3.1.5 Analyse structurale des sites actifs des STT versus MetX-HST

En parallèle de notre travail expérimental sur les SST, Karine Bastard (LABGeM) a analysé les sites actifs des 3 sous-groupes MetX-G3a, b et c (figure 87). En 2013, la structure de DcsE, enzyme impliquée dans le métabolisme de la D-cyclosérine chez *Streptomyces lavendulae* et codée en fait par un gène *metX* (Uniprot ID : D2Z028 ; PDB ID : 3VVL), et par ailleurs décrite comme étant une acétyl-transférase, avait été analysée par Oda et ses collaborateurs pour expliquer la spécificité de substrat L-sérine versus L-homosérine de ces paralogues⁴⁰⁵. On retrouve DcsE, à laquelle nous allons consacrer une section ultérieurement, dans le sous-groupe G3a. Cette protéine avait été intégrée par Karine dans le set des MetX dont la structure avait été déterminée pour modéliser les MetX. Dans le groupe MetX-G3, les deux sous-groupes MetX-G3a et MetXG3c, composés respectivement de procaryotes et (principalement) de champignons, présentent le motif Ala-Leu-Ser-(Pro/Ala) décrit par Oda et al.⁴⁰⁵ en positions 1 à 4 du logo du site actif (figure 87). Ces acides aminés forment une région pivot impliquée dans la formation de la cavité de l'oxyanion qui joue un rôle important dans la spécificité du substrat en stabilisant la sérine par liaison hydrogène. En effet le « trou oxyanion » formé au sein du site actif constitue une poche capable de stabiliser un état de transition d'une réaction enzymatique via des liaisons hydrogènes à un oxygène déprotoné, comme c'est le cas par exemple chez les protéases à sérine⁴⁰⁶. En revanche, chez les enzymes du sous-groupe MetX-G3b qui possèdent un motif similaire Gly-Ile-Ser-Ala, la présence d'un résidu Tyr conservé en position 9 de leur logo (faisant face aux résidus P1 à P4) empêche la stabilisation de la L-sérine par la cavité oxyanion et favorise la liaison de la L-homosérine à la place. Ainsi, à cause de cette tyrosine, le substrat sérine ne peut pas être stabilisé dans les enzymes MetX-G3b comme c'est le cas dans MetX-G3a ou dans MetX-G3c.

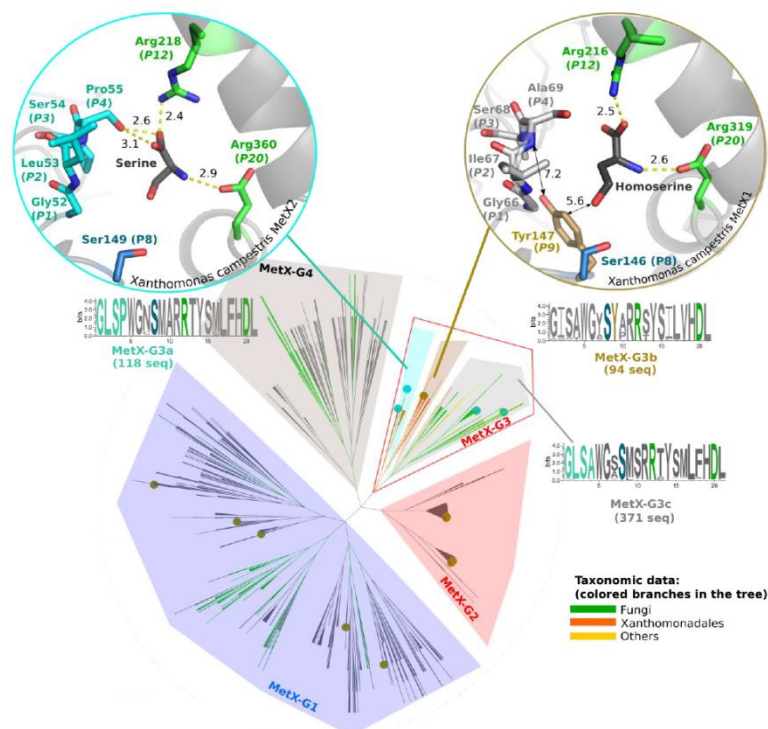


Figure 87 : Arbre de clustering hiérarchique des sites actifs de MetX généré par ASMC (issu de Bastard et al., 2017). Les groupes MetX-G3a et MetX-G3b sont respectivement illustrés par les modèles d'homologie MetX2 (Uniprot Id: Q8P8L2) et MetX1 (Uniprot Id: A0A1D3PD87) de *Xanthomonas campestris*. La cavité de l'oxyanion se retrouve aux positions P1 à P4 des logos.

Ces analyses bioinformatiques montrent donc que les deux sous-groupes MetX-G3a et MetX-G3c sont constitués d'enzymes qui utilisent préférentiellement la L-sérine, tandis que les enzymes du sous-groupe MetX-G3b effectuent la succinylation de l'homosérine.

Cette analyse laisse ainsi supposer que l'activité SST pourrait aussi exister chez les MetX procaryotes du sous-groupe MetX-G3a, dont le site actif est structuralement semblable à celui des Cys2 eucaryotes du groupe G3c. Le sous-groupe MetX-G3a est presque exclusivement composé de MetX de γ -protéobactéries de la classe des Xanthomonadales. Par ailleurs, comme pour les levures, ces bactéries semblent avoir deux gènes *metX* chacun dans un cluster G3 différent, suggérant déjà des fonctions distinctes. Nous avons donc souhaité savoir si ces MetX étaient aussi impliquées dans le métabolisme de biosynthèse de la L-cystéine.

3.1.6 Des L-sérine O-succinyltransférases chez les procaryotes ?

Les MetX procaryotes du groupe G3 capables de succinyler la L-homosérine (données du criblage global) sont réparties dans les sous-groupes minoritaires MetX-G3a et G3b. De nombreuses bactéries représentées dans ces groupes ont en fait deux copies de MetX, chacune dans un groupe. L'arbre phylogénétique des MetX dont l'activité L-homosérine acyltransférase a été caractérisée expérimentalement (figure 88), montre également une proximité phylogénétique entre les MetX de *Frateuria* ou *Xanthomonas* du groupe MetX-G3a par exemple et les Cys2-SST de *S. pombe* ou *A. nidulans* de MetX-G3c. A l'inverse, les deuxièmes MetX de *Frateuria* et *Xanthomonas* du groupe MetX-G3b sont plus éloignées de celles-ci et forment un groupe très distinct des autres MetX. La comparaison des séquences protéiques réalisée par Karine des enzymes Cys2 avec les MetX-HST2 issues du groupe MetX-G3a a finalement montré qu'il y a en moyenne plus de 40 % d'identité entre ces deux groupes d'enzymes.

En faisant l'étude bibliographique sur la synthèse de la méthionine chez les Xanthomonadales, j'ai trouvé que Qian et al. avaient obtenu un mutant $\Delta metA$ chez *X. campestris* auxotrophe à la méthionine⁴⁰⁷. En réalité ce gène est mal nommé car il est homologue à un gène *metX* qui code pour une protéine MetX-HST2 classée dans le groupe G3b. Comme pour les levures, on se retrouve donc avec deux MetX paralogues dont une seule semble essentielle à la biosynthèse de la L-méthionine.

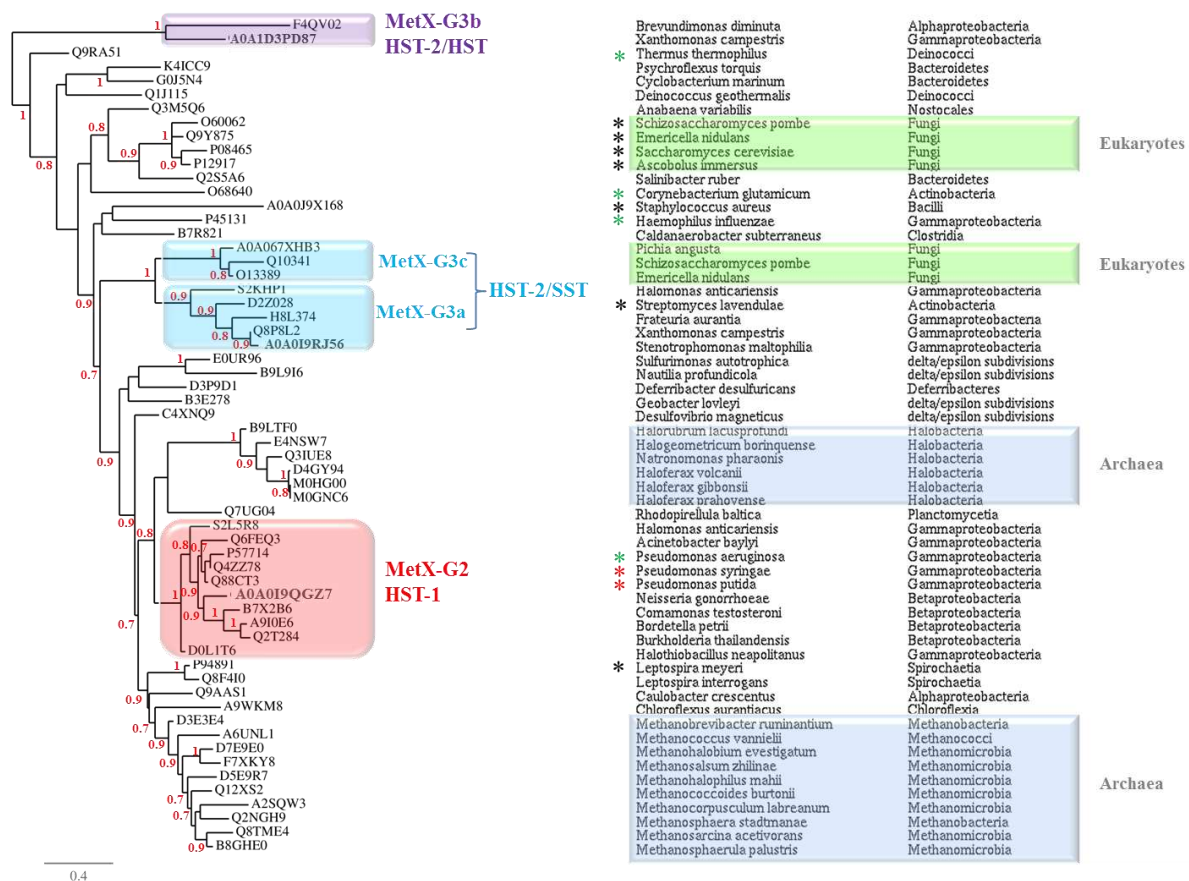


Figure 88 : Arbre phylogénétique des MetX possédant une activité L-homosérine O-acyltransférase.

(*) = Les enzymes dont les données proviennent uniquement de la littérature et non du criblage acyl-CoA réalisé au Genoscope lors du criblage global des deux familles MetX et MetA. Les données bibliographiques en accord ou en désaccord avec les résultats expérimentaux sont respectivement marquées d'un astérisque vert ou rouge. Seules les enzymes utilisant le succinyl-CoA sont encadrées sur l'arbre phylogénétique, et leur groupe ASMC correspondant est écrit sur leur droite. Les archées et les eucaryotes sont surlignés en bleu et vert respectivement. (Issu de Bastard et al., 2017).

L'analyse des contextes génomiques qui a été réalisée constitue un élément allant également dans ce sens. En observant le contexte génomique de ces deux MetX homologues chez trois Xanthomonadales, ici *X. campestris*, *Frateruia aurantia* et *Stenotrophomonas maltophilia* (figure 89), on remarque en effet que seules les MetX-HST2 du groupe G3b sont co-localisées avec les enzymes de la voie de biosynthèse de la méthionine (codées par les gènes *metB/hom*). Une autre singularité de ces organismes a été notée : aucun de ces trois organismes ne possède de gène *cysE* ou *srpH* codant pour l'enzyme SAT nécessaire à la synthèse de l'OAS à partir de la L-sérine, et cette caractéristique semble partagée par toutes les γ -protéobactéries possédant une MetX-HST2 du groupe G3a, qui se trouvent être potentiellement des SST (étude faite par Karine mais non montrée ici).

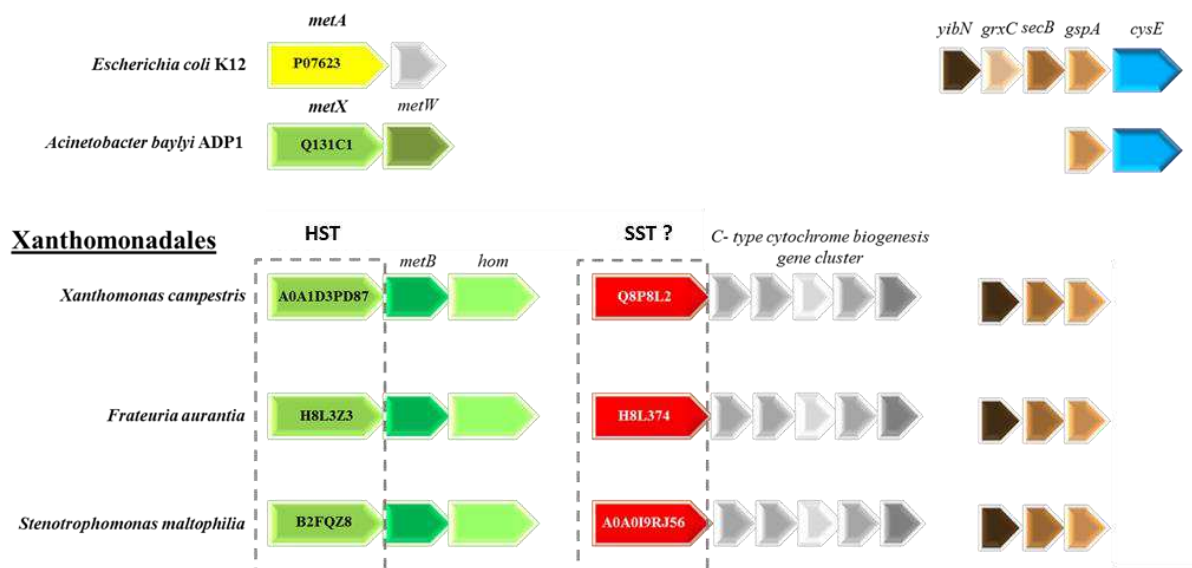


Figure 89 : Contextes génomiques de gènes codant pour des MetX du groupe MetX-G3 de Xanthomonadales. Les enzymes issues du groupe MetX-G3b sont à gauche sous l’acronyme « HST » et celles issues de MetX-G3a sont à droite sous l’acronyme « SST ? ». Le gène codant pour la SAT CysE est co-localisé dans les génomes d’*E. coli* et ADP1 avec *gspA*, qui code pour la glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Les clusters de gènes liés à la biosynthèse de la méthionine sont en vert. Les gènes *hom* et *metB* codent pour une L-homosérine déshydrogénase et une cystathionine γ -synthase, respectivement.

Au vu de ces analyses *in silico*, l’hypothèse que ces paralogues soient des SST impliquées également dans la biosynthèse de la L-cystéine nous a semblé très probable.

3.1.6.1 Validation *in vitro* de l’activité SST de diverses Xanthomonadales

L’hypothèse selon laquelle ces enzymes seraient des SST a été validée via l’exploration des capacités d’acétylation de plusieurs candidats MetX-HST2 du groupe G3a, dont les activités spécifiques HAT, HST, SAT et SST ont été mesurées selon le protocole utilisé pour les Cys2 et indiquées dans le tableau 12. Trois des quatre MetX-HST2 testées sont des Xanthomonadales (γ -protéobactéries majoritaires au sein de ce groupe), alors que *Halomonas anticariensis* est une Oceanospirillale. Pour comparaison, la deuxième MetX de *X. campestris* du groupe G3b a aussi été testée. Les quatre enzymes du groupe G3a ont présenté une activité SST plus importante que l’activité HST mais contrairement aux Cys2 testées, la différence entre les activités HST et SST est moins marquée voir similaire (de 21 à 57 % de l’activité SST selon les enzymes). L’activité SST la plus élevée a été mesurée pour la MetX-HST2 (MetX-G3a) de *F. aurantia* avec 30,7 $\mu\text{moles d’OSS produites}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Ces chiffres sont toutefois plus élevés que ceux relevés pour les activités relatives HST (3 et 6 %) mesurées pour les deux Cys2 de *S. pombe* et *A. nidulans* par rapport à leur activité principale SST. Dans nos conditions, les activités spécifiques des enzymes procaryotes testées sont 3 à 100 fois plus fortes que celles des Cys2. Ces enzymes semblent également capables d’utiliser faiblement l’acétyl-CoA et une très légère mais significative activité SAT a été mesurée avec les MetX de *Frateuria* et *Halomonas*.

Groupe ASMC MetX-HST2	Organisme	Identifiant Uniprot	Activité spécifique (nmole.min ⁻¹ .mg ⁻¹)			
			HAT	HST	SAT	SST
G3a	<i>Xanthomonas campestris</i>	Q8P8L2	14	1,57·10 ³	9	4,44·10 ³
	<i>Frateuria aurantia</i>	H8L374	60	1,75·10 ³	307	3,07·10 ⁴
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	A0A019RJ56	0	110	9	512
	<i>Halomonas anticariensis</i>	S2KHP1	0	730	105	1,39·10 ³
G3b	<i>Xanthomonas campestris</i>	A0A1D3PD87	0	2·10 ³	0	0

Tableau 12 : Activités spécifiques L-homosérine et L-sérine O-acyltransférases de MetX-HST2 procaryotes. Dosages effectués à 25°C en présence de 5 mM de L-homosérine ou de L-sérine et de 300 µM d'acyl-CoA. Les valeurs correspondent à la moyenne de deux répliques.

L'activité O-acyltransférase de la seconde MetX-HST2 (MetX-G3b) de *X. campestris* a aussi été mesurée mais aucune activité SST n'a pu être détectée, tandis que son activité HST a bien été confirmée (2·10³ nmoles.min⁻¹.mg⁻¹).

Ces résultats semblent donc confirmer que l'activité des isoenzymes MetX du groupe G3b est liée à la succinylation de la L-homosérine et donc à la biosynthèse de la méthionine, alors que leurs homologues du groupe G3a peuvent accepter la L-sérine comme substrat et en effectuent la succinylation et non l'acétylation. Afin de mieux définir leur implication dans le métabolisme de la L-cystéine, nous avons donc, comme pour l'enzyme fongique Cys2_{pombe}, vérifié la nature du métabolite produit par ces MetX-HST2 procaryotes et déterminé les paramètres cinétiques de MetX G3a appartenant à des bactéries de l'ordre des Xanthomonadales.

3.1.6.2 Validation in vitro de la formation d'OSS

La MetX-HST2 G3a de *Xanthomonas campestris* (MetX-HST2_{campestris} G3a) a été à son tour surexprimée chez *E. coli* et purifiée par FPLC au LGBM. L'enzyme a alors été mise en présence de succinyl-CoA et de L-sérine pendant 20 min. Un témoin négatif sans enzyme a également été préparé. Les standards chimiques NSS et OSS synthétisés au laboratoire ont à nouveau servi de référents. Les résultats de l'analyse MS² de cette expérience sont présentés sous la forme de chromatogrammes (figure 90). Dans le test contenant l'enzyme, deux pics sont apparus comme pour Cys2_{pombe}, l'un à 7,25 min correspondant à celui de l'OSS et un second à 8,22 min correspondant notamment à la conversion de l'OSS enzymatique en NSS à pH basique (8,1), et probablement dans une moindre mesure à la formation spontanée de NSS à partir de L-sérine et de succinyl-CoA. Ces résultats confirment bien que la MetX du groupe G3a forme également de l'OSS, démontrant pour la première fois l'existence d'une L-sérine-O-succinyltransférase bactérienne.

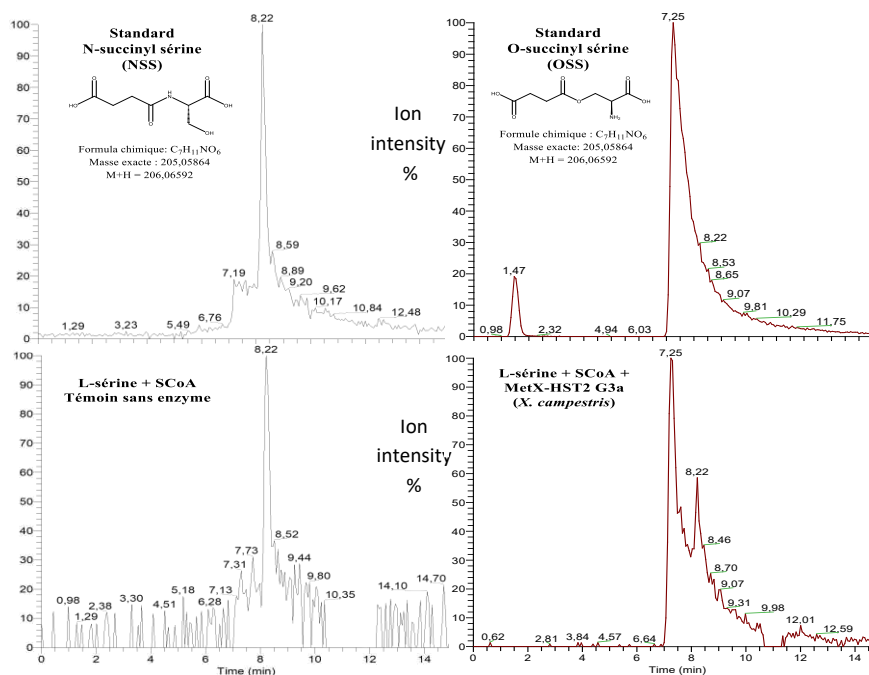


Figure 90 : Chromatogrammes LC-MS du produit de la réaction SST réalisée par MetX-HST2_{campestris} G3a. Le milieu réactionnel comportait l'enzyme MetX-HST2_{campestris} G3a, du succinyl-CoA (SCoA), de la L-sérine et le tampon Tris/HCl pH 8,1. L'analyse a été faite en mode positif via le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Elite™ du LGBM. Chromatogrammes obtenus pour la détection de l'ion moléculaire OSS [M+H]⁺ avec le rapport m/z= 206,0659.

De l'acétyl-L-sérine a également pu être détectée lorsque l'enzyme MetX-HST2_{campestris} G3a a été mise en présence d'acétyl-CoA ; cependant la méthode de séparation utilisée, adaptée aux isomères OSS et NSS mais pas aux isomères OAS et NAS, a conduit à une faible résolution chromatographique pour la séparation des pics OAS et NAS lors de l'injection des standards commerciaux. Les temps de rétention de ces deux isomères s'étant avérés très proches (respectivement 4,52 et 4,59 min) et leur profil de fragmentation étant semblables, nous n'avons pas conclu quant à l'origine de l'acétyl-L-sérine produite (données non incluses).

Pour la suite du manuscrit, et dans un souci de clarté, les MetX du groupe G3a dont nous avons prouvé l'activité SST pour 4 membres seront nommées Cys2-like pour les distinguer des MetX-HST du groupe G3b. Afin de confirmer que les enzymes procaryotes Cys2-like sont impliquées *in vivo* dans le métabolisme de biosynthèse de la L-cystéine, des expériences similaires à celles menées chez *S. pombe* ont été conduites. Et ce en commençant par la détermination des paramètres cinétiques de deux Cys2-like de Xanthomonadales, famille majoritaire de ce groupe.

3.1.6.3 Paramètres cinétiques de MetX-HST2 de deux Xanthomonadales : *Xanthomonas campestris* et *Frateuria aurantia*

X. campestris et *F. aurantia* sont des γ -protéobactéries appartenant à la même famille, les Xanthomonadaceae, et leurs Cys2-like respectives possèdent 66,6 % d'identité de séquence. Pour information, ces deux bactéries Gram-négatives présentent des intérêts industriels divers, mais *Xanthomonas* est notamment connue pour sa phytopathogénicité : elle est en effet responsable de la bactériose du bananier et cause de très importantes pertes de rendement dans les bananeraies en particulier de l'Est de l'Afrique⁴⁰⁸. La découverte d'un gène spécifique de ce pathogène pourrait ainsi potentiellement offrir une cible de choix pour la mise au point d'un antibactérien ciblé.

La détermination des paramètres cinétiques des Cys2-like de *X. campestris* et *F. aurantia* s'est faite par spectrophotométrie via le suivi de la rupture de la liaison thioester à 232 nm comme pour Cys2_{pombe}. Les résultats sont représentés dans le tableau 13, où sont également rappelés les résultats obtenus pour la Cys2 de *S. pombe*. Comme pour Cys2_{pombe}, la L-sérine semble être l'acide aminé le mieux accepté par les enzymes Cys2-like, avec des Km de l'ordre du mM contre un Km de l'ordre de la centaine de mM pour la L-homosérine, traduisant une affinité très faible pour la L-homosérine. Le Km obtenu sur succinyl-CoA avec Cys2-like_{campestris} s'est avéré 10 fois plus faible que celui obtenu sur acétyl-CoA. On peut remarquer que Cys2-like_{aurantia}, qui nous était apparue comme la plus forte en activité spécifique, a un Km 10 fois plus faible que celui de Cys2-like_{campestris} mais finalement une efficacité catalytique similaire. Finalement, l'efficacité catalytique de ces enzymes pour la réaction SST est relativement forte, de $2,5 \cdot 10^5$ à $6,6 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, contre $5,6 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ pour l'activité SAT pour Cys2-like_{campestris}. L'efficacité catalytique pour la réaction SAT de Cys2-like_{aurantia} n'a pas pu être déterminée car le Km élevé pour l'acétyl-CoA demandait d'engager des concentrations trop élevées en acétyl-CoA entraînant la saturation du signal du spectrophotomètre.

		$k_{\text{cat}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_m \text{ (mM)}$	$k_{\text{cat}}/K_m \text{ (s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}\text{)}$
Cys2-like <i>X. campestris</i> (Q8P8L2)	L-sérine ¹	24,9 ± 1,7	1,2 ± 0,16	2,10E+04
	succinylCoA ^a		9,84E-2 ± 1,27E-2	2,48E+05
	acétylCoA ^b	0,86 ± 0,18	1,5 ± 4,1E-2	5,61E+02
	L-homosérine ¹	88,5 ± 2,7	224 ± 16	3,94E+02
Cys2-like <i>F. aurantia</i> (H8L374)	L-sérine ²	50 ± 6	1,4 ± 0,11	3,24E+04
	succinylCoA ^c		8,3E-2 ± 3,6E-3	6,56E+05
	acétylCoA ^c	nd	≥ 6	nd
	L-homosérine ¹	182 ± 15	406 ± 65	4,48E+02
Cys2 <i>S.pombe</i> (Q10341)	L-sérine ²	7,4 ± 1,4	1,2 ± 0,08	6,20E+03
	succinylCoA ^a		2,5E-2 ± 5,1E-3	3,00E+05
	acetylCoA ^c	0,16 ± 7,7E-3	4,5E-2 ± 7,5E-3	3,50E+03
	L-homoserine ¹	13,81 ± 2,1	738 ± 44	19

(1) Concentration fixe succinyl-CoA = 500 μM

(2) Concentration fixe succinyl-CoA = 600 μM

nd = non déterminé

(a) Concentration fixe L-sérine = 6 mM

(b) Concentration fixe L-sérine = 7 mM

(c) Concentration fixe L-sérine = 8 mM

Tableau 13 : Paramètres cinétiques des Cys2-like de deux Xanthomonadales. Les résultats des Cys2-like de *X. campestris* (Uniprot Q8P8L2) et de *F. aurantia* (UniprotH8L374) sont comparés avec Cys2_{pombe} pour laquelle on a rappelé les valeurs dans ce tableau. Chaque valeur correspond à la moyenne de deux répliques.

Comme pour l'enzyme Cys2 fongique testée, le succinyl-CoA est le co-facteur préférentiel des Cys2-like de Xanthomonadales, et les paramètres cinétiques obtenus laissent penser que l'activité SST de ces enzymes est compatible avec la formation *in vivo* d'OSS. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons adapté le protocole de culture et d'extraction du métabolome de *S. pombe* à *X. campestris*, et tenté de mettre en évidence la production d'OSS chez cette Xanthomonadale.

3.1.6.4 Validation *in vivo* de la biosynthèse d'OSS chez *X. campestris*

Pour faire une extraction de métabolome il est préférable de cultiver le microorganisme sur un milieu minimum afin d'éliminer au maximum les composés inutiles qui produiraient un foisonnement de molécules lors de l'analyse en LC-MS, plus difficilement interprétable. La première étape qui s'est révélée finalement difficile comparée à cette étape de mise au point pour *S. pombe*, a été de trouver le milieu adéquat car *X. campestris* est un phytopathogène poussant lentement en milieu minimum et qui produit une substance gluante très gênante. Une demi-douzaine de milieux pauvres ont été ainsi testés afin d'optimiser le temps de croissance nécessaire pour atteindre une DO de 0,8 non seulement en milieu liquide mais également une fois la bactérie mise sur filtre. Le milieu minimum pour *Xanthomonas* (MMX)⁴⁰⁹ a finalement été abandonné au profit d'une modification du milieu VMX⁴¹⁰, qui est lui-même un dérivé du milieu minimum de Vincent (VMM) utilisé pour la bactérie aérobique du sol *Rhizobium*⁴¹¹ mais adapté à *X. campestris*. Ce milieu a été renommé VMX+ et sa composition est donnée en matériel et méthodes. Une fois la culture de *X. campestris* en milieu VMX+ filtrée, sa croissance sur milieu solide s'est cependant avérée sévèrement ralentie, l'empêchant d'atteindre au moins deux temps de génération. Le milieu VMX+ a donc été renforcé avec 0,03 % (m/v) d'extrait de levure, réduisant le temps de génération environ 6-7 h et permettant de passer d'une DO de 0,2 à 0,8 en une nuit. Le protocole d'extraction des métabolites sur filtre utilisé pour *S. pombe* a ensuite été utilisé en ne modifiant que le nombre de filtres engagés dans l'extraction pour augmenter la biomasse et le nombre de cycles chaud/froid pour casser les cellules. Il est à noter que la production de xanthane, substance gélatineuse, par *X. campestris* aussi bien en milieu liquide que solide ont rendus assez imprécises les mesures de DO.

Les résultats obtenus pour la recherche de l'OSS dans le métabolome de *X. campestris* sont exposés dans la figure 91. Les standards OSS et NSS ont à nouveau également été injectés, avec des temps de rétention respectifs de 7,8 et 8,9 mins. L'extraction du métabolome de ce phytopathogène a été réalisée à 4 reprises et la détection de l'OSS n'a pu être certifiée que dans 2 métabolomes avec un signal relativement faible. Il s'agit néanmoins de la première fois que la présence d'OSS est détectée dans le métabolome d'un procaryote, avec un temps de rétention semblable de 7,8 mins et également la détection de NSS à 8,94 mins, les transitions énergétiques mesurées correspondant à celles obtenues avec les standards. Cependant, comparé au signal obtenu chez *S. pombe*, le rapport signal/bruit est ici beaucoup plus faible ; une raison pouvant expliquer que l'intensité du signal de l'OSS dans le métabolome de *X. campestris* atteint à peine 10³ cps (« count per second »), soit 2 fois plus faible que chez *S. pombe* alors qu'en théorie un plus grand volume de cellules ont été lysées, pourrait être dû à l'ajout de 0,03 % d'extrait de levure dans le milieu, un apport en cystéine pouvant potentiellement inhiber la production d'OSS. Pour essayer d'optimiser encore la croissance de *X. campestris* et obtenir plus de biomasse, le milieu VMX+ a été à nouveau modifié afin de s'exempter

de l'extrait de levure tout en s'assurant de la croissance sur filtre de *X. campestris* en milieu minimum. Les tests de croissance sur ce nouveau milieu renforcé en oligo-éléments (voir matériel et méthode) ce sont révélés fructueux mais j'ai dû malheureusement arrêter mon implication à cette étape pour écrire le manuscrit et le protocole a été transmis à Pascal qui a réussi récemment en duplica à confirmer avec un meilleur signal la production d'OSS par Cys2-like_{campestris}. Aucune trace d'OAS n'a pu être détectée dans ces conditions.

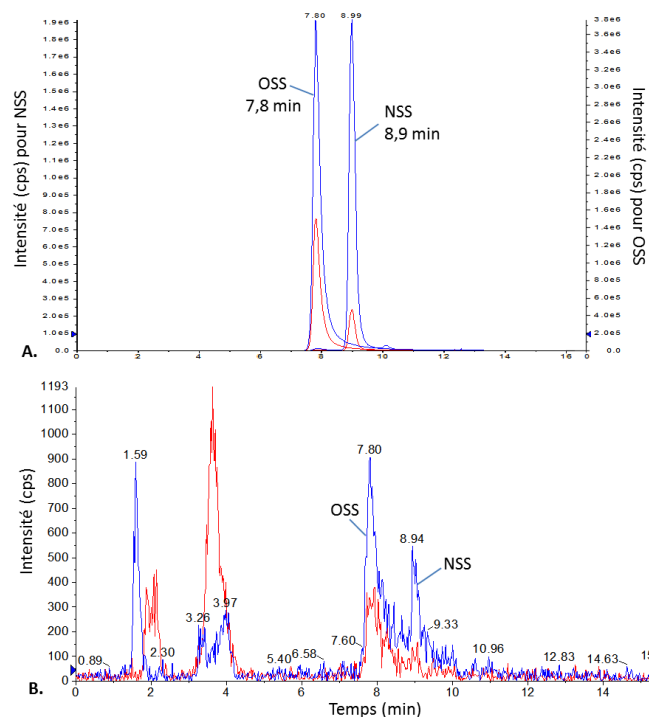


Figure 91 : Détection de l'OSS dans le métabolome de *X. campestris*. La recherche d'OSS et de NSS a été effectuée par LC-MS sur QTRAP® 5500 en utilisant le mode MRM et une ionisation positive. Les chromatogrammes des ions extraits (XIC) présentés correspondent aux transitions de deux paires d'ions : en bleu, 204 → 103,9 ; en rouge 204→ 117,1. A. Standards de référence OSS et NSS. B. Métabolome extrait de cellules *X. campestris*.

En résumé nous avons montré *in vitro* que certaines enzymes du groupe ASMC MetX-HST2, en particulier les enzymes fongiques Cys2 du groupe G3c et leurs homologues Cys2-like du groupe G3a composé de procaryotes notamment issus de l'ordre des Xanthomonadales, catalysent la formation d'OSS via l'activité SST. L'OSS constitue un nouveau métabolite, impliqué dans le métabolisme de la cystéine, et dont la présence a été démontrée *in vivo* chez *S. pombe* et chez *X. campestris*. Appartenant pourtant à la même famille d'enzyme MetX, les Cys2 et Cys2-like semblent être de fait des enzymes paralogues aux MetX impliquées dans le métabolisme de la L-méthionine. Plusieurs interrogations demeurent néanmoins autour de l'activité de ces SST :

- À l'image des enzymes MetX-HAT et HST, les activités HST et SST sont-elles intervertibles par simple mutation?
- L'OSS étant présent *in vivo*, cela implique que ce nouveau métabolite est logiquement pris en charge par les enzymes suivantes de la voie de biosynthèse de la cystéine, c'est-à-dire les cystéine synthases,

mais est-ce bien le cas ?

- Les champignons et les Xanthomonadales sont-ils les seuls organismes à pouvoir produire l'OSS ?

3.1.7 SST et HST, deux activités intervertibles ?

3.1.7.1 Sélection des mutations en P9 du logo et construction des mutants MetX HST et SST de *X. campestris*.

La modélisation des sites actifs des deux paralogues de MetX (MetX-HST et Cys2-like) de *X. campestris* a permis comme nous l'avons vu d'identifier un résidu volumineux en P9 du logo qui fait face aux résidus impliqués dans la formation du trou de l'oxyanion, stabilisateur de la L-sérine (en P1 à P4 du logo). La présence de cette L-tyrosine pourrait empêcher la L-sérine d'être stabilisée favorisant plutôt la L-homosérine, qui vient se placer devant elle, augmentant l'encombrement du trou de l'oxyanion. Karine s'est donc interrogée sur la possibilité d'intervertir les activités SST et HST en mutant cette position clef du site actif (P9) pour chacune de ces enzymes. Deux mutants ont donc été construits et isolés à l'aide du kit « QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis », dont le principe est exposé dans l'annexe 8. Ce kit permet d'effectuer des mutations ponctuelles sur l'ADN et de ne récupérer que l'ADN muté nouvellement synthétisé en utilisant les propriétés de l'endonucléase Dpn I, spécifique de l'ADN méthylé ou hémiméthylé (l'ADN isolé de presque toutes les souches d'*E. coli* est méthylé et donc susceptible de subir une digestion par Dpn I).

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la tyrosine en P9 du logo du site actif des MetX-HST2 empêche la succinylation de la L-sérine, il a été choisi de muter ce résidu par le même résidu qui se trouve à la position équivalente chez la Cys2-like (Uniprot ID : Q8P8L2) de *X. campestris* : une L-méthionine (figure 92).

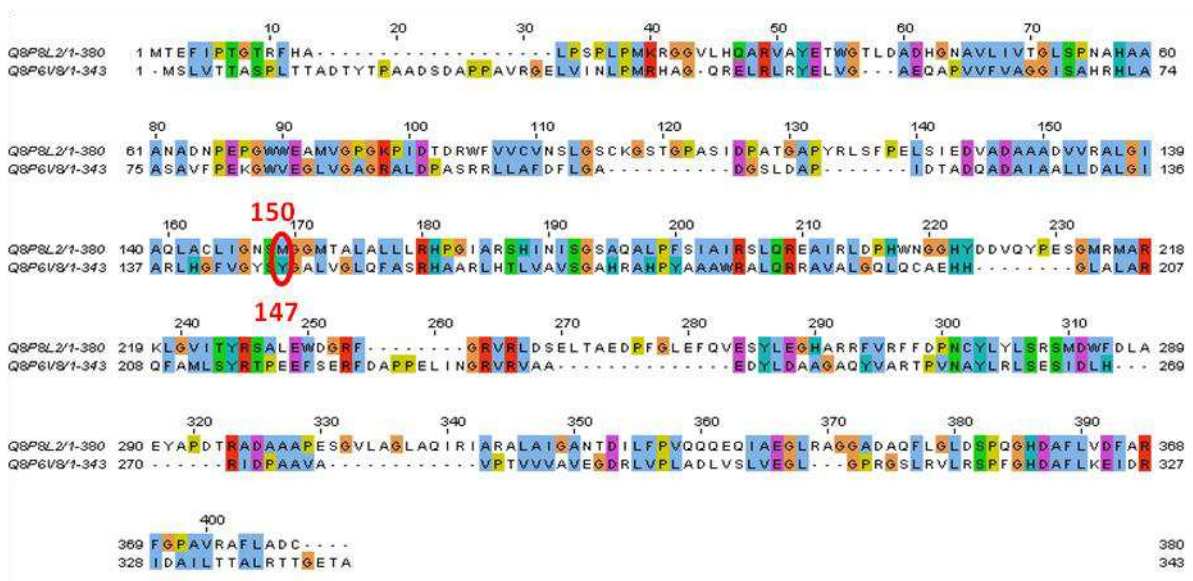


Figure 92 : Alignement de séquence des deux protéines MetX-HST2 et Cys2-like de *X. campestris*. La position P9 du logo du site actif est entourée d'un ovale rouge. La position exacte dans chacune des séquences est notée en rouge.

Dans la même logique, le résidu méthionine présent en P9 dans la MetX-HST2 (Q8P6V8) a été muté par une tyrosine. Finalement les deux mutants MetX-HST2 Y147M et Cys2-like M150Y ont été obtenus ; les enzymes ont alors été surexprimées et purifiées sur mini-colonne Qiagen™ afin de tester leur activité SST et HST.

3.1.7.2 Caractérisation biochimiques des mutants MetX de *X. campestris*

Les activités spécifiques HST et SST mesurées sur les mutants sont indiquées dans le tableau 14, où sont également rappelées les activités acyltransférases des formes sauvages de MetX-HST2 et Cys2-like de *X. campestris*. La mutation M150Y effectuée sur Cys2-like n'a pas permis de faire basculer son activité vers celle d'une HST, bien qu'elle ait globalement perdu de son activité SST (-63 %), montrant sans doute quand même une altération de la stabilité de la L-sérine. À l'inverse, l'activité faible HST qui avait été mesurée sur l'enzyme sauvage n'a pas été accrue, et on observe également une diminution de son activité spécifique.

		Activité spécifique (nmole.min ⁻¹ .mg ⁻¹)			
		HAT	HST	SAT	SST
MetX-G3a (SST)	<i>X. campestris</i> wt (Q8P8L2)	5,3	595,6	8,9	4444,4
	<i>X. campestris</i> M150Y	0	334,6	0	1667,1
MetX-G3b (HST2)	<i>X. campestris</i> wt (Q8P6V8)	0	202,5	0	0
	<i>X. campestris</i> Y147M	0	901,5	0	25,6

Tableau 14 : Activités spécifiques L-homosérine et L-sérine O-acyltransférases des enzymes mutées MetX-HST2 et MetX-SST de *X. campestris*, ainsi que de leur forme sauvage (wt) respective. Dosages effectués à 25 °C en présence de 5 mM de L-homosérine ou de L-sérine et de 300 µM d'acyl-CoA. Les valeurs correspondent à la moyenne de deux répliques.

Contre toute attente, la mutation Y147M effectuée sur l'enzyme MetX-HST2 n'a non seulement pas permis de faire basculer son activité HST vers SST, mais l'activité HST a été au contraire améliorée d'un facteur 4,5. Cette amélioration de l'activité HST s'accompagne de l'apparition d'une très légère activité SST de 25,6 nmoles.min⁻¹.mg⁻¹, beaucoup moins spectaculaire qu'attendue.

Pour tenter d'expliquer ces résultats, une modélisation du site actif du mutant Y147M de l'enzyme MetX-HST a été réalisée par Karine (LABGeM). Dans la MetX-SST, le résidu Met, équivalent au résidu Tyr chez la HST, a sa chaîne latérale tournée vers le « cœur hydrophobe » de la protéine ; la place est « libre » et le trou de l'oxyanion est bien présent. La sérine est stabilisée par cette cavité, tandis que l'homosérine prend une mauvaise configuration dans la poche catalytique : elle est attirée et stabilisée par le motif Ala-Leu-Ser-(Pro/Ala) et se trouve alors plus distante de la sérine catalytique. Or chez le mutant Y147M, la chaîne latérale de la méthionine se retrouve dirigée vers la poche catalytique et non vers le cœur hydrophobe, ne favorisant pas la L-sérine. On peut toutefois

s'interroger sur la cause de ces positionnements très différents de chaînes latérales de ces acides aminés en P9 dans les deux paralogues MetX. En effet, pourquoi la chaîne latérale de la méthionine chez la SST se retrouve enfouie tandis que la chaîne latérale de la tyrosine chez les HST2 se retrouve dans le site actif ? L'hypothèse émise par Karine est que les enzymes MetX-SST et MetX-HST2 auraient divergé il y a suffisamment longtemps pour que les résidus impliqués dans la formation du "cœur hydrophobe" soient différents entre les deux protéines.

Nous avons donc décidé de muter cette position Y147 avec un résidu à chaîne latérale encore plus courte, comme l'alanine, afin de stabiliser la sérine. Le mutant Y147A a donc ainsi été obtenu et testé. De même, un nouveau mutant de la MetX-SST dont l'activité HST a été diminuée au lieu d'être augmentée dans le mutant M150Y, a été réalisé en utilisant cette fois-ci un résidu chargé, telle que la lysine. L'objectif de cette mutation M150K étant ici d'essayer d'éviter que la chaîne latérale de la tyrosine introduite à la place de la méthionine ne se positionne comme cette dernière dans le cœur hydrophobe de l'enzyme.

Les résultats obtenus avec ces nouveaux mutants se sont avérés décevants et n'ont pas pu apporter d'éléments supplémentaires. En effet, la mutation Y147A a entraîné des difficultés pour purifier MetX-HST2, la perte d'activité observée étant probablement due à la faible quantité d'enzyme récupérée suite à la lyse cellulaire. Quant à la mutation M150K, elle n'a pas non plus permis de faire basculer la MetX-SST vers une activité HST bien qu'une diminution de l'activité SST de 25 % a été mesurée, bien moins cependant que dans le mutant M150Y.

		Activité spécifique (nmole.min ⁻¹ .mg ⁻¹)			
		HAT	HST	SAT	SST
MetX-G3a (SST)	<i>X. campestris</i> wt	5,3	595,6	8,9	4444,4
	<i>X. campestris</i> M150K	0	387,2	0	3326,9
MetX-G3b (HST2)	<i>X. campestris</i> wt	0	202,5	0	0
	<i>X. campestris</i> Y147A	0	0	0	0

Tableau 15 : Activités spécifiques L-homosérine et L-sérine O-acyltransférases des enzymes mutées MetX-HST2 et MetX-SST de *X. campestris*, ainsi que de leur forme sauvage (wt) respective. Dosages effectués à 25°C en présence de 5 mM de L-homosérine ou de L-sérine et de 300 µM d'acyl-CoA. Les valeurs correspondent à la moyenne de deux répliques.

Au vu de la nature et du rôle des autres logos au sein du site actif, aucun autre résidu candidat n'a été testé.

3.1.8 Utilisation de l'OSS par les cystéine synthases

Jusqu'à notre étude, l'acétylation de la L-sérine par des SAT dans l'avant dernière étape de la voie de biosynthèse de la L-cystéine était considérée comme l'unique voie d'activation de la L-sérine (hormis le cas de *Mycobacterium* et de l'utilisation directe de la 3-phosphosérine, cf. introduction), et l'OAS formé comme l'unique substrat des cystéines synthases (ou O-acétyl-L-sérine sulfhydrylases) pour la biosynthèse de la L-cystéine. Puisque l'OSS est produit *in vivo* comme nous l'avons démontré et qu'il est comme nous le supposons l'intermédiaire de la voie de biosynthèse de la L-cystéine, il est nécessaire qu'il soit alors substrat de la cystéine synthase (CS) de ces microorganismes.

Pour confirmer cette assertion, nous avons évalué la capacité des CS de *S. pombe* et des deux Pseudomonadales pour lesquelles nous avons réalisé une étude détaillée des MetX-SST, à utiliser l'OSS.

En vue de déterminer les paramètres cinétiques sur OSS et OAS de CS représentatives, les gènes codant pour la cystéine synthase de *S. pombe* ($CysK_{pombe}$), ainsi que ceux codant pour les CS de *X. campestris* ($CysK_{campestris}$) et *F. aurantia* ($CysK_{aurantia}$) ont été clonés au laboratoire et les enzymes surexprimées dans *E. coli* puis purifiées par FPLC par le LGBM. Les CS ont ensuite été testées en spectrophotométrie. Mentionnons que $CysK_{pombe}$ a été étudiée par Aline pendant que j'étudiais les deux $CysK$ bactériennes mais pour pouvoir les comparer je présenterai donc aussi ce travail. Par contre j'ai été en charge des validations de production de L-cystéine en LC-MS des trois enzymes. Les réactions de sulfhydrylation ont été réalisées à la fois sur OAS et OSS (figure 93), avec le Na_2S comme source de soufre réduit, dans le but de déterminer également si ces CS sont spécifiques d'un type d'acyl-L-sérine ou si elles font preuve d'une plus grande promiscuité de substrat.

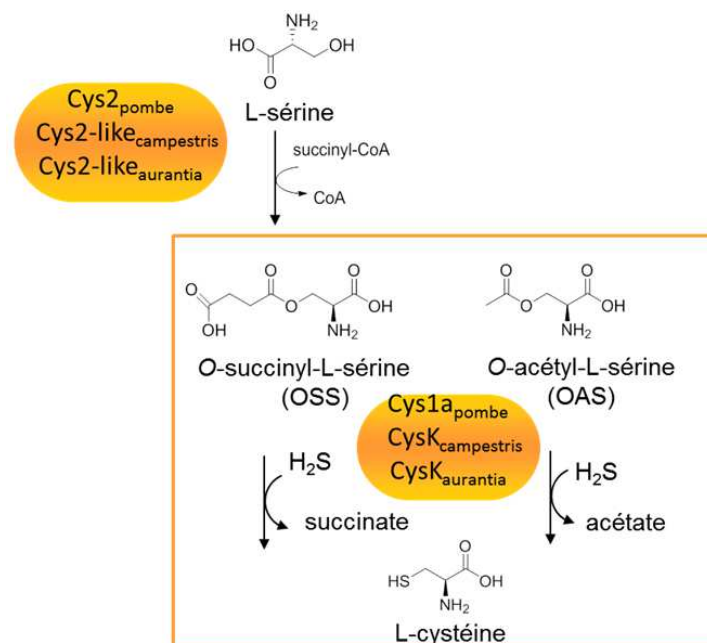


Figure 93 : Exploration expérimentale des réactions catalysées par les cystéine synthases ($CysK/Cys1a$) d'organismes contenant une MetX-SST.

Les paramètres cinétiques ont été calculés par dosage de l'acétate ou du succinate libéré lors de l'utilisation d'OAS ou d'OSS par la CS, respectivement. Nous avons utilisé deux kits commerciaux de chez Megazyme couplant 3 enzymes pour suivre la disparition du NADH à 340 nm, le premier étant dédié au dosage de l'acétate et le second à celui du succinate (figure 94) ; ce test a été adapté par Aline (LCAB) aux conditions de nos cystéine synthèses.

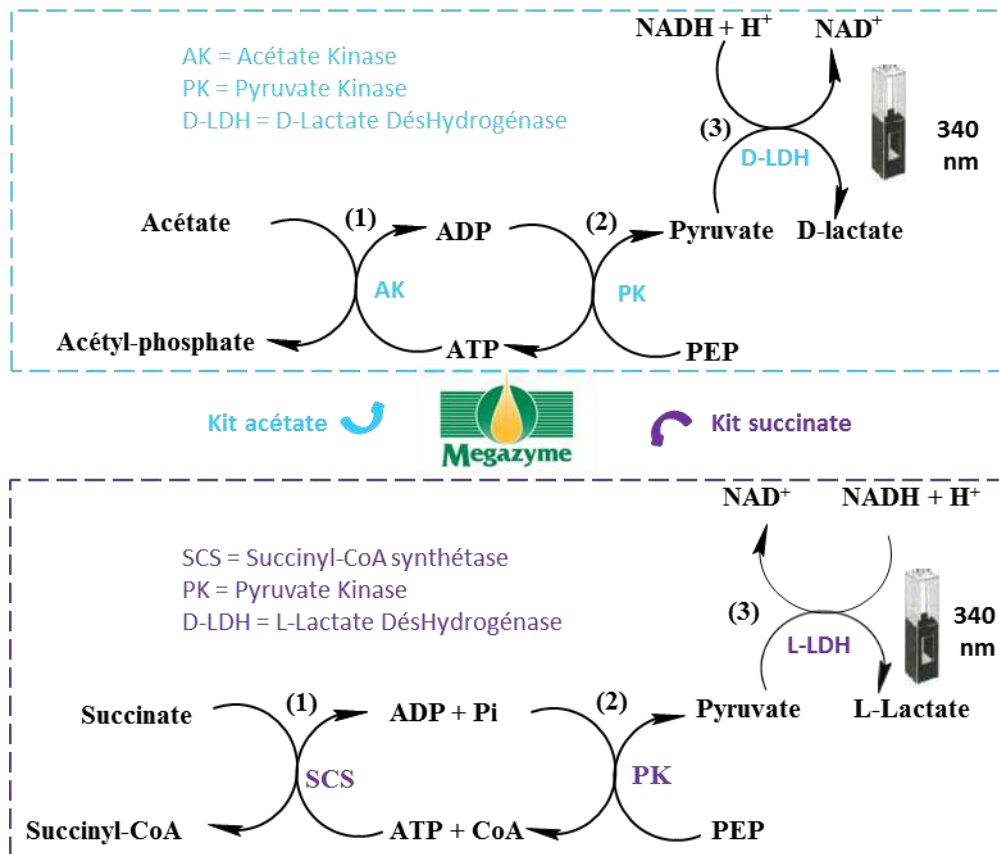


Figure 94 : Dosage du succinate et de l'acétate produits lors de la synthèse de la L-cystéine à partir de l'OSS ou de l'OAS, via l'utilisation des kits Megazyme K-SUCC 04/17 et K-ACETAK 04/14 respectivement.

3.1.8.1 Paramètres cinétiques de la cystéine synthase Cys1a de *S. pombe*

Il existe deux cystéine synthèses, Cys1a (SPBC36.04) et Cys1b (SPAC3A12.17c), annotées dans le génome de *S. pombe*. Des expériences de mutations ont été réalisées par Fujita et Takegawa révélant que seul un mutant Δ cys1a conduit à une auxotrophie à la L-cystéine et que même la surexpression de Cys1b ne lève pas cette auxotrophie⁴¹². Sur la base de cet article, nous avons focalisé dans un premier temps notre étude sur Cys1a (UniProt ID : O59701) pour savoir si l'OSS est réellement substrat de Cys1a et les efficacités catalytiques (k_{cat}/K_m) de l'enzyme sur OAS et OSS ont été déterminées puis comparées (tableau 16).

Substrat	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ . M ⁻¹)
Na ₂ S ¹	2,64 ± 7,4E-2	0,335 ± 0,04	7,9E+03
OSS ²	3 ± 3E-2	0,24 ± 0,013	1,3E+04
OAS ²	1,47 ± 0,13	0,325 ± 0,08	4,5E+03

(¹) Concentration fixe succinyl-CoA = 5 mM

(²) Concentration fixe Na₂S = 2 mM

Tableau 16 : Paramètres cinétiques de la cystéine synthase Cys1a de *S. pombe* (issu de Bastard et al., 2017). Chaque valeur correspond à la moyenne de deux répliquas.

Les paramètres cinétiques de Cys1a montrent que cette enzyme est capable non seulement d'utiliser l'OSS comme nous l'avions prédit mais qu'elle est presque trois fois moins efficace avec l'OAS qu'avec l'OSS ($4,5 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ contre $1,3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, tableau 16), même si son efficacité catalytique est élevée pour l'OAS. Pour valider cette caractérisation, la formation *in vitro* de L-cystéine en présence de Na₂S, d'OSS et de Cys1a a par ailleurs été confirmée en LC-MS, comme le montrent la figure 95 et les spectres MS correspondant en annexe 6.

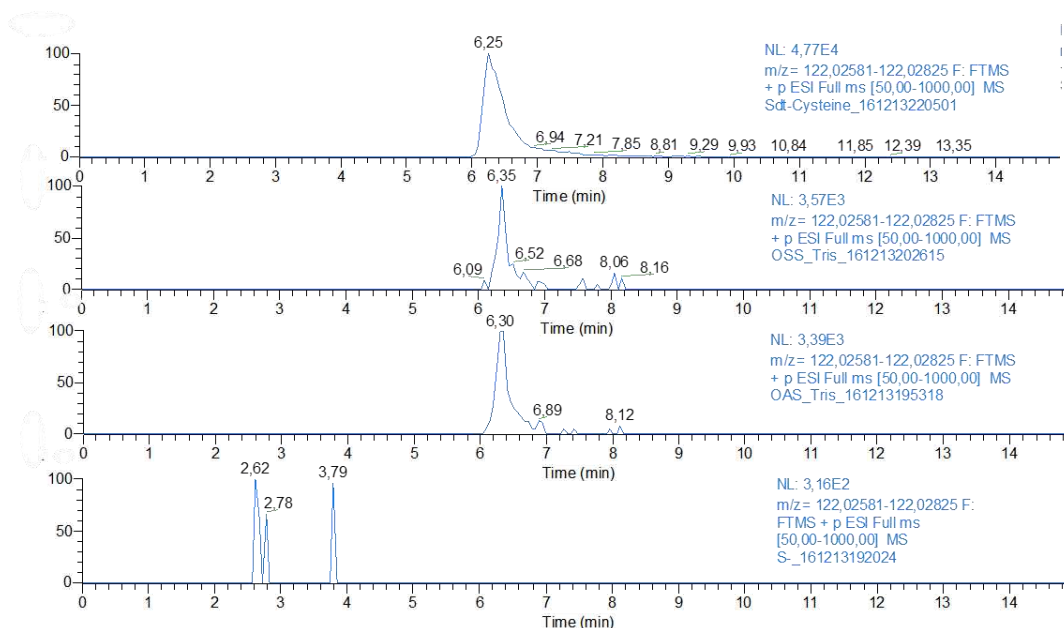


Figure 95 : Mise en évidence de la formation de L-cystéine par CysK_{pombe} en présence d'OSS. L'analyse a été faite en mode positif via l'appareil Orbitrap Elite™. Chromatogrammes obtenus à 10 ppm de précision pour la détection de l'ion moléculaire L-cystéine [M+H]⁺ au rapport m/z= 122,02703. De haut en bas : standard L-cystéine ; L-cystéine enzymatique produite via l'OSS puis via l'OAS ; témoin sans O-acyl-L-sérine (même résultat obtenu avec le témoin sans enzyme).

Les paramètres cinétiques de Cys1a indiquent qu'il s'agit d'une enzyme michaélienne. Les enzymes dites michaéliennes fonctionnent selon le mode suivant : un substrat S se lie avec une enzyme E pour former le complexe enzyme-substrat ES à la concentration [ES]. Ce complexe intermédiaire se dissocie ensuite pour donner un produit P avec régénération de l'enzyme E. Chaque site actif se

comporte indépendamment des autres, qu'il n'y en ait qu'un par unité enzymatique ou plusieurs. Nous verrons ultérieurement que ce n'est pas le cas de toutes les CS.

L'ensemble de ces résultats confirme que l'OSS observé *in vivo* est utilisée pour la biosynthèse de la L-cystéine chez la levure *S. pombe*.

3.1.8.2 Paramètres cinétiques des cystéine synthèses de *X. campestris* et *F. aurantia*

Pour comparer les capacités catalytiques des CS de levures et celles bactériennes vis-à-vis de l'OSS, les cystéine synthèses CysK de *X. campestris* (CysK_{campestris}, Uniprot ID : Q8P600) et de *F. aurantia* (CysK_{aurantia} Uniprot ID : H8L2V2) ont donc été purifiées et testées selon le même protocole que CysK_{pombe}. Afin d'avoir une enzyme bactérienne d'un organisme ayant une SAT et pas de MetX-STT, la cystéine synthase d'*Acinetobacter baylyi* ADP1 (Uniprot ID : Q6FBQ5) a été purifiée au laboratoire. Lorsque nous avons déterminé les paramètres cinétiques sur Na₂S des CS de *X. campestris* et *F. aurantia*, en fixant la concentration en OSS à un niveau saturant, *ie* à au moins 5 fois le Km, leurs CysK respectives ont présenté un comportement michaëlien, comme Cys1a. Cependant les cinétiques enzymatiques obtenues pour l'OAS et l'OSS se sont avérées différentes de Cys1a.

Pour rappel, afin de réaliser l'étude cinétique d'une enzyme, il faut se placer dans des conditions expérimentales particulières dites de Michaëlis, à savoir : une concentration en substrat [S] très largement supérieure à la concentration totale en enzyme [E]₀, afin d'atteindre [ES] = [E]₀ (la vitesse initiale de réaction est alors proportionnelle à la quantité d'enzyme introduite) et l'absence ou quasi-absence de produit (ce qui est le cas lors de la phase initiale de la réaction, où le rapport [ES]/[E]₀ est maximum et où la vitesse initiale est mesurable). Si l'on représente ces vitesses initiales en fonction des concentrations de substrat testées on peut voir que les vitesses mesurées croissent en fonction des concentrations du substrat mais que cette relation n'est pas linéaire : le graphe de cette fonction est une hyperbole définie par l'équation de Michaëlis-Menten $V_i = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$. L'asymptote à cette courbe hyperbolique correspond à la vitesse initiale qu'on observerait si la concentration en substrat était infinie, c'est à dire à la vitesse maximum possible ou V_m. Si l'on prend le point de la courbe pour lequel l'ordonnée est égale à la moitié de celle de l'asymptote, on trouve alors en abscisse de ce point la concentration de substrat pour laquelle on peut mesurer une vitesse initiale égale à la moitié de la V_m. On appelle cette concentration la constante de Michaëlis ou Km.

Cependant, lorsque les paramètres cinétiques sur OSS et OAS ont été déterminés pour chaque enzyme bactérienne, avec une concentration en Na₂S fixe, les quatre courbes obtenues se sont avérées plus proches d'une sigmoïde que d'une hyperbole (figure 96). Ces sigmoïdes représentant les vitesses *v* obtenues à des concentrations variées [S] d'*O*-acyl-L-sérine ont été générées à l'aide de l'équation générale de Hill $v = (V_{\max}S^n)/(S_{50} + S^n)$, où S₅₀ est la concentration en substrat pour laquelle l'enzyme est à 50% de sa V_m et *n* le coefficient de Hill ou coefficient de coopérativité. Ce type de cinétique enzymatique est caractéristique des enzymes allostériques : celles-ci ont une affinité vis à vis du substrat qui n'est pas constante ou bien voient leur vitesse maximum changer en fonction de la

concentration des effecteurs, cofacteurs ou substrats. Ce sont par ailleurs souvent des protéines oligomériques, le coefficient de Hill permettant ainsi d'évaluer le degré d'interaction entre les sous-unités d'une protéine ($n = 1$ si aucune interaction). Comme attendu pour des enzymes allostériques, les analyses oligomériques effectuées par Christine (LGBM) par chromatographie de gel filtration de CysK_{Campestris} et CysK_{Aurantia} ont montré que ces enzymes étaient dimériques.

L'allostérie correspond ainsi à la capacité de ces enzymes à changer de structure spatiale lorsqu'elles se lient à un effecteur en un site différent (allostérique) du site actif, cette liaison se traduisant par une modification de l'activité. Cela peut être une autre molécule de substrat ou de produit : on parle alors d'effet allostérique homotrope, par opposition à l'effet allostérique hétérotrope lorsque l'effecteur est une molécule différente. Cette cinétique allostérique est plus lente que la cinétique michaëlienne pour les petites concentrations de substrat et devient plus rapide au-delà, où un phénomène de coopération se met en place. Ainsi au-delà du point d'inflexion de cette sigmoïde, l'accélération de la vitesse de réaction entre deux concentrations de substrat sera plus grande que dans le cas d'une enzyme michaëlienne. Cette propriété de coopérativité des monomères donnerait ainsi un avantage aux systèmes allostériques dans la régulation de la vitesse de réaction.

L'état actuel des connaissances sur la régulation post-transcriptionnelle des CS qui utilisent l'OAS laisse penser que la formation du complexe CysE-CysK (le CSC, présenté en introduction) est leur principal régulateur, bien que son rôle dans le métabolisme de la cystéine diffère probablement entre les plantes et les bactéries. Cependant, à ce stade de notre étude nous ne savons pas si les SST sont capables de former un complexe avec la cystéine synthase, ce qui implique que l'on ne sait pas non plus si cette allostérie est un mécanisme qui s'additionne ou qui se substitue à ce mécanisme de régulation. En outre, le H₂S est connu pour stabiliser le CSC même en présence d'OAS, probablement en occupant un site de fixation allostérique. Or, un seul site de fixation allostérique a été pour le moment décrit, sur la CysK de *S. typhimurium*⁴¹³ cristallisée en présence de Cl⁻ ce qui pourrait expliquer qu'à notre connaissance, aucune CS allostérique n'a été décrite. Une des questions qui se pose est : existe-t-il un site de fixation allostérique sur les CysK d'organismes produisant l'OSS ?

Afin de vérifier que l'allure générale sigmoïdale des cinétiques des deux CysK bactériennes correspond bien à un comportement allostérique sur OSS et OAS, nous avons soumis les cinétiques mesurées à la représentation d'Eadie-Hofstee : son équation $v_i = f\left(\frac{v_i}{[S]}\right) = -K_m \frac{v_i}{[S]} + V_m$ permet de déterminer les paramètres K_m et V_m d'une enzyme Michælienne, en obtenant une droite dont la pente est $-K_m$; cependant si l'enzyme possède un comportement coopératif, celui-ci sera illustré non pas par une droite mais par une courbe à l'allure de virgule. Ainsi quatre virgules ont été obtenues en utilisant cette représentation mathématique sur les cinétiques enzymatiques de ces CysK bactériennes (figure 96). Enfin, pour confirmer le fonctionnement allostérique de ces enzymes via une deuxième méthode, le coefficient de Hill « n » a également été calculé par régression linéaire via la représentation de Hill selon l'équation $\log[v/(V_{max}-v)]$ versus $\log S$ et sa régression linéaire.

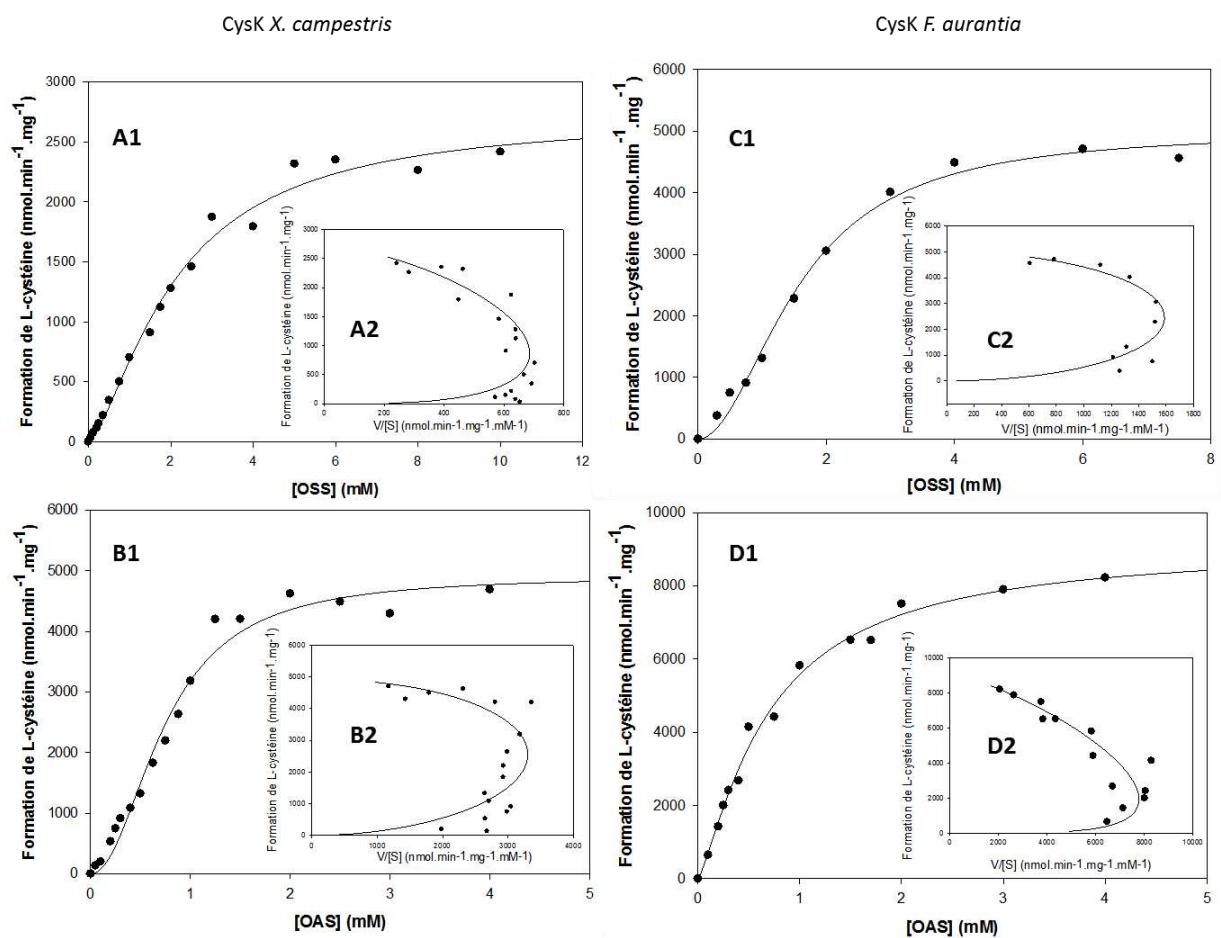


Figure 96 : Comparaison du comportement cinétique de la sulfhydrylation de l'OSS et de l'OAS par les cystéine synthases CysK de *X. campestris* et *F. aurantia*. A1 et B1, représentation de la vitesse de formation de L-cystéine par mg d'enzyme en fonction respectivement de la concentration en OSS et OAS chez *X. campestris* (v versus $[S]$), à l'aide de l'équation de Hill du logiciel SigmaPlot (Systat Software, Inc.). A2 et B2, représentations d'Eadie-Hofstee (v versus $v/[S]$), des valeurs présentées en A1 et B1 respectivement. C1 et D1, équivalents graphiques de A1 et B1 sur OSS et OAS avec la CS de *F. aurantia*, et avec en C2 et D2 les représentations d'Eadie-Hofstee correspondantes.

L'ensemble des paramètres cinétiques obtenus via les équations énumérées précédemment sont indiqués dans le tableau 17. Pour CysK_{campestris}, compte tenu des valeurs similaires obtenues pour la V_{max} d'une part ($2,9 \text{ s}^{-1}$ et $1,6 \text{ s}^{-1}$ sur l'OAS et l'OSS respectivement) et le S_{50} d'autre part ($0,75 \text{ mM}$ et $2,13 \text{ mM}$ sur OAS et OSS respectivement), on peut affirmer que la cystéine syntase est aussi efficace avec l'OAS ou l'OSS comme substrat (données équivalentes avec CysK_{frateuria}). En effet, de façon anecdotique, alors que pour Cys1a_{pombe} la préférence de substrat semblait très légèrement dirigée vers celle de l'OSS (efficacité catalytique ~ 3 fois supérieure à celle mesurée sur OAS), ici l'activité spécifique mesurée à V_m sur OSS est environ 2 fois inférieure à celle obtenue sur OAS, que ce soit pour CysK_{aurantia} ou CysK_{campestris}. Ce faible écart montre ainsi que ces enzymes peuvent aussi efficacement prendre en charge l'OSS pour synthétiser la L-cystéine.

	<i>X.c.</i>	<i>F.a.</i>	<i>X.c.</i>	<i>F.a.</i>	<i>X.c.</i>	<i>F.a.</i>
Substrat	k_{cat} (s ⁻¹)		K_m (mM)		k_{cat}/K_m (s ⁻¹ .M ⁻¹)	
Na ₂ S ⁽¹⁾	1,36 ± 0,06	3,03 ± 0,09	0,022 ± 0,004	0,16 ± 0,02	6,05E4	1,95E4
Substrat	V_{max} (s ⁻¹)		S_{50} (mM)		n	
OSS ^(2,3)	1,59 ± 0,09	2,89 ± 0,12	2,13 ± 0,21	1,58 ± 0,11	1,47 ± 0,14 (1,3 ± 0,04)	1,96 ± 0,19 (1,74 ± 0,11) 1,27 ± 0,12
OAS ^(2,3)	2,87 ± 0,13	5,26 ± 0,28	0,75 ± 0,05	0,7 ± 0,08	2,08 ± 0,24 (1,66 ± 0,1)	0,12 (1,29 ± 0,04)

⁽¹⁾ Concentration fixe OSS = 10 mM

⁽²⁾ Concentration fixe Na₂S pour **CysK_X.c.** = 0,3 mM

⁽³⁾ Concentration fixe Na₂S pour **CysK_F.a.** = 1,5 mM

Tableau 17 : Paramètres cinétiques des cystéine synthases CysK de *X. campestris* et de *F. aurantia*.

Chaque valeur correspond à la moyenne de deux répliques. La valeur de n indiquée sans parenthèse a été obtenue par ajustement itératif non linéaire des données, celle entre parenthèses a été obtenue par régression linéaire.

Enfin, alors que CysK_{pombe} a un comportement purement michaëlien, j'ai pu confirmer que les CysK bactériennes testées sont des enzymes allostériques (nombre de Hill $n > 1$), avec un comportement coopératif positif. En outre, il serait intéressant de rechercher la potentielle présence d'un site allostérique de fixation de l'OSS.

3.1.8.3 Les SST forment elles un complexe avec la cystéine synthase ?

Même si l'allostérie pourrait être un mode de régulation de cette voie chez les Xanthomonadales, nous avons également cherché à savoir si les CS de ces organismes pourraient être régulées via la formation d'un complexe avec les SST par analogie avec les complexes CSC (CS/SAT). Chez *Salmonella enterica*⁴¹⁴ ou *E. coli*⁴¹⁵ chez qui ce complexe a été étudié, plusieurs résidus situés dans les dix derniers acides aminés de la protéine entrent dans le site actif de la cystéine synthase. Ce complexe est ainsi stabilisé par plusieurs de ces résidus, dont le dernier, une isoleucine très conservée chez les SAT de type CysE (SrpH ne forme pas de complexe avec la CS), est indispensable mais pas suffisante pour sa formation. La question sous-jacente est : est-ce que, comme la SAT CysE, l'interaction entre CysK et Cys2 peut avoir lieu grâce à son extrémité C-ter (voir introduction section 1.1.1.2) ?

Pour rechercher cette région d'interaction chez les SST, les séquences protéiques des quatre SST testées expérimentalement ont été alignées sur leur partie C-ter et comparées avec la SAT d'*E. coli*

K12 ou de *S. enterica* (figure 97). Aucune des quatre SST ne possède d'isoleucine à la position finale résidu 10. Cette première observation semble suggérer qu'il est peu probable qu'un complexe se forme entre les SST et sa CysK correspondante compte tenu des éléments apportés par la littérature sur la formation de ce complexe. Cette situation ne serait cependant pas exceptionnelle et est rencontrée chez d'autres SAT bactériennes comme chez CysE de *Brucella abortus*, chez qui il a été prouvé qu'aucun complexe ne se formait malgré la présence de l'isoleucine en C-ter⁴¹⁶.

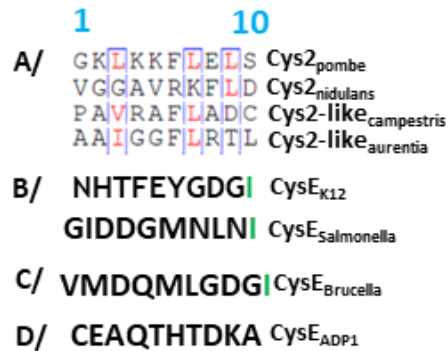


Figure 97 : Comparaison des décapeptides présents en C-ter des SST testées avec la partie C-ter de CysE d'E. coli K12. A/ La recherche d'une séquence consensus parmi les 4 SST a été réalisée à l'aide du programme ESPrit 3.0 (esprpt.ibcp.fr) ; les résidus équivalents colorés sont ceux retrouvés dans au moins 50 % des séquences. B/ Extrémités C-ter de CysK d'E. coli (Uniprot ID : P0A9D4) et de *Salmonella enterica* (Uniprot ID : P29847) chez qui le résidu isoleucine final nécessaire bien que non suffisant à la formation du complexe est indiqué en vert. C/ Extrémité C-ter de CysE de *Brucella abortus* (Uniprot ID : Q2YQG6) qui ne permet pas la formation du complexe avec la CS. D/ Partie C-ter de CysE d'ADP1.

Chez l' α -protéobactérie *Brucella abortus*, la queue C-ter de sa CysE est compatible avec la formation du CSC mais pourtant le complexe ne se forme pas ; cela est dû à la présence des résidus Glu96 et Tyr125 qui empêchent l'interaction de la queue de sa CysE avec le site actif de sa CysK_{abortus} (figure 98). Or CysK_{abortus} possède 45% d'identité avec la Cys1a de *S. pombe*. En alignant leurs séquences, ainsi que celles de *Xanthomonas* et *Frateuria*, il s'avère que les deux premières possèdent un résidu Tyr en position 125, et que les deux Xanthomonadales possèdent un résidu Phe au lieu d'un résidu Glu en position 96. Ces résidus volumineux Phe96 chez les Xanthomonadales et Tyr125 pour *S. pombe* pourraient ainsi interférer avec l'insertion de la queue C-ter des SAT ou SST et empêcher leur interaction avec leur site actif. Ces éléments supplémentaires diminuent la probabilité qu'un complexe se forme entre les SST et leur CysK. Il est à noter que l'analyse de la partie C-ter de CysE d'ADP1 suggère d'ailleurs également que l'absence d'une isoleucine en P10 compromet la formation d'un complexe avec CysK_{ADP1}.

ne produit pas d'OSS mais de l'OAS, la cystéine synthase d'ADP1 (CysK_{ADP1}) a été purifiée également au laboratoire.

Les activités spécifiques vis-à-vis de l'OSS ont été mesurées et les résultats présentés en tableau 18. Globalement, CysK_{ADP1} est capable d'utiliser efficacement l'OSS alors que seulement des traces d'activité ont été mesurées pour CysM_{campestris} et Cys1b_{pombe}. Le résultat pour Cys1b_{pombe} ne nous a guère étonnés puisque l'activité cystéine synthase n'a pas été mise en évidence in vivo⁴¹². Pour CysK_{ADP1} alors qu'aucune SST n'est présente dans le génome d'ADP1 et que plusieurs SAT ont pu être identifiées, cette capacité à utiliser l'OSS suggère qu'il s'agit d'activité latente chez CysK. Cependant, l'activité spécifique de CysK_{campestris} vis-à-vis de l'OSS est 9 fois supérieure à celle de CysK_{ADP1}.

		Activité spécifique sur OSS (nmole.min ⁻¹ .mg ⁻¹)
Cystéine synthase A	CysK de <i>X. campestris</i>	981,6 ± 221,1
	CysK de ADP1	118,5 ± 7,9
Cystéine synthase B	CysM de <i>X. campestris</i>	4,8 ± 0,4
	Cys1b de <i>S. pombe</i>	9,5 ± 1,6

Tableau 18 : Comparaison des activités spécifiques L-sérine O-succinyltransférases (SST) des CS A et B de *X. campestris*, de la CS A d'*A. baylyi* et de la CS B de *S. pombe*. Dosages effectués à 25 °C en présence de 2 mM d'OSS et de Na₂S. Les valeurs correspondent à la moyenne de deux répliques.

Pour étudier de manière plus approfondie CysK_{ADP1} vis-à-vis de ces deux substrats, les paramètres cinétiques ont été déterminés et sont présentés et discutés dans la section suivante.

3.1.8.5 Comparaison avec CysK d'*A. baylyi* ADP1

La CS CysK d'*Acinetobacter baylyi* ADP1 (CysK_{ADP1}) a également été étudiée. Ses paramètres cinétiques sont exposés dans le tableau 19, le K_m mesuré pour le Na₂S ayant été réalisé cette fois en présence d'OAS, substrat théoriquement naturel de sa CS puisque *A. baylyi* ne possède pas de SST. Les résultats montrent qu'elle prend préférentiellement l'OAS, avec une efficacité catalytique du même ordre que l'enzyme Cys1a de *S. pombe* avec l'OSS. Ce résultat est en accord avec le fait qu'ADP1 ne possède pas d'homologue MetX impliqué dans la biosynthèse de la L-cystéine, et n'a ainsi pas les moyens d'en synthétiser à partir d'OSS puisqu'elle ne produit que de l'OAS à partir d'une de ses SAT.

CysK d'<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1 (CysK_{ADP1})			
Substrat	Kcat (s⁻¹)	Km (mM)	Kcat/Km (s⁻¹.M⁻¹)
Na ₂ S ⁽¹⁾	16,38 ± 1,00	0,12 ± 0,02	1,33E5
OAS ⁽²⁾		1,21 ± 0,18	1,36E4
Substrat	V_{max} (s⁻¹)	S₅₀ (mM)	<i>n</i>
OSS ⁽²⁾	0,35 ± 0,01	2,69 ± 0,18	1,57 ± 0,11 (1,43 ± 0,05)

⁽¹⁾ Concentration fixe OAS = 6 mM

⁽²⁾ Concentration fixe Na₂S = 0,3 mM

Tableau 19 : Paramètres cinétiques de la CS CysK d'*Acinetobacter baylyi* ADP1 (Uniprot ID : Q6FBQ5). Chaque valeur correspond à la moyenne de deux réplicas. La valeur de *n* entre parenthèses a été obtenue à partir de la représentation de Hill et non de l'équation de la sigmoïde. La valeur de *n* indiquée sans parenthèse a été obtenue par ajustement itératif non linéaire des données, celle entre parenthèses a été obtenue par régression linéaire.

Néanmoins, en présence d'OSS, CysK_{ADP1} catalyse malgré tout la biosynthèse de L-cystéine en faible quantité, avec une activité spécifique de 576,8 nmoles.min⁻¹.mg⁻¹ (valeur consignée à la V_{max} de l'enzyme, soit une V_m de 0,35 s⁻¹). De plus, alors que cette CS présente un comportement michaëlien sur Na₂S ainsi que sur OAS, l'enzyme se montre allostérique sur OSS (annexe 7). Enfin, alors que les constantes de demi-saturation sont similaires sur OAS (K_m = 1,2 mM) et OSS (S₅₀ = 2,7 mM), la vitesse à saturation de substrat est 50 fois plus élevée sur OAS (k_{cat} = 16,4 s⁻¹) que sur OSS (V_{max} = 0,35 s⁻¹). Ensemble, ces données montrent que l'efficacité de CysK_{ADP1} à catalyser la synthèse de la cystéine à partir de l'OAS est environ 10² à 10³ fois supérieure à la synthèse réalisée via l'OSS. Pour rappel, avec la CS de *S. pombe*, cette différence n'était que d'un facteur 3 en faveur de l'OSS.

Ainsi, la promiscuité de substrat qui a été observée pour les cystéine synthèses d'organismes possédant une enzyme Cys2 ou Cys2-like à l'activité SST semble atténuée chez *A. baylyi*, où l'enzyme CysK apparaît bien plus spécifique de son substrat naturel OAS. Cela laisse penser que les CS des champignons et des Xanthomonadales auraient évolué vers une spécialisation vis-à-vis de l'OSS mais que cette activité n'est pas apparue brutalement dans la famille CysK chez qui cette activité pourrait être latente.

Pour conclure, nous avons donc montré à la fois sur deux Ascomycètes et deux Xanthomonadales que la biosynthèse de la L-cystéine était réalisée via un paralogue de *metX* qui code pour une *O*-succinyl-L-sérine transférase via un nouveau métabolite, l'*O*-succinyl-L-sérine (figure 99) et que leurs cystéine synthèses se sont sans doute spécialisées dans l'utilisation de l'OSS.

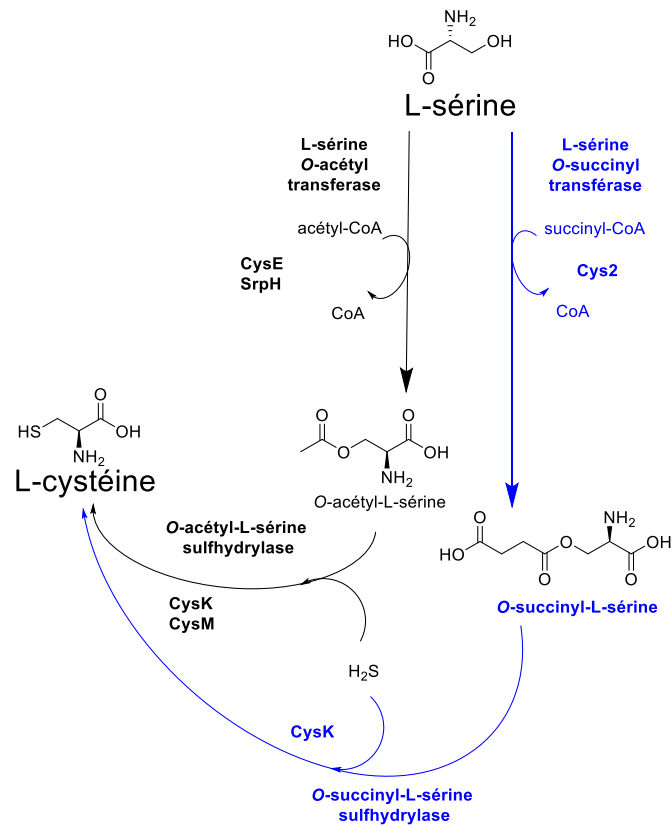


Figure 99 : Voies de biosynthèse de la L-cystéine chez les procaryotes et les fungi. En bleu, la nouvelle voie de succinylation de la L-sérine décrite chez *S. pombe* par Bastard et al. (2017)

Le travail sur ce groupe de paralogue de metX impliqué dans la biosynthèse de la L-cystéine a permis de compléter l'étude effectuée sur les grandes familles MetX et MetA, dont la majorité est impliquée dans la biosynthèse de la L-méthionine. Il a notamment permis d'établir un arbre de décision (figure 100) basé sur les déterminants structuraux exposés tout au long du manuscrit et étayés par plus d'une centaine d'enzymes MetX ou MetA étudiées expérimentalement et pour lesquelles j'ai testé une trentaine de candidats pour l'activité SST et déterminé les paramètres cinétiques pour quatre d'entre elles.

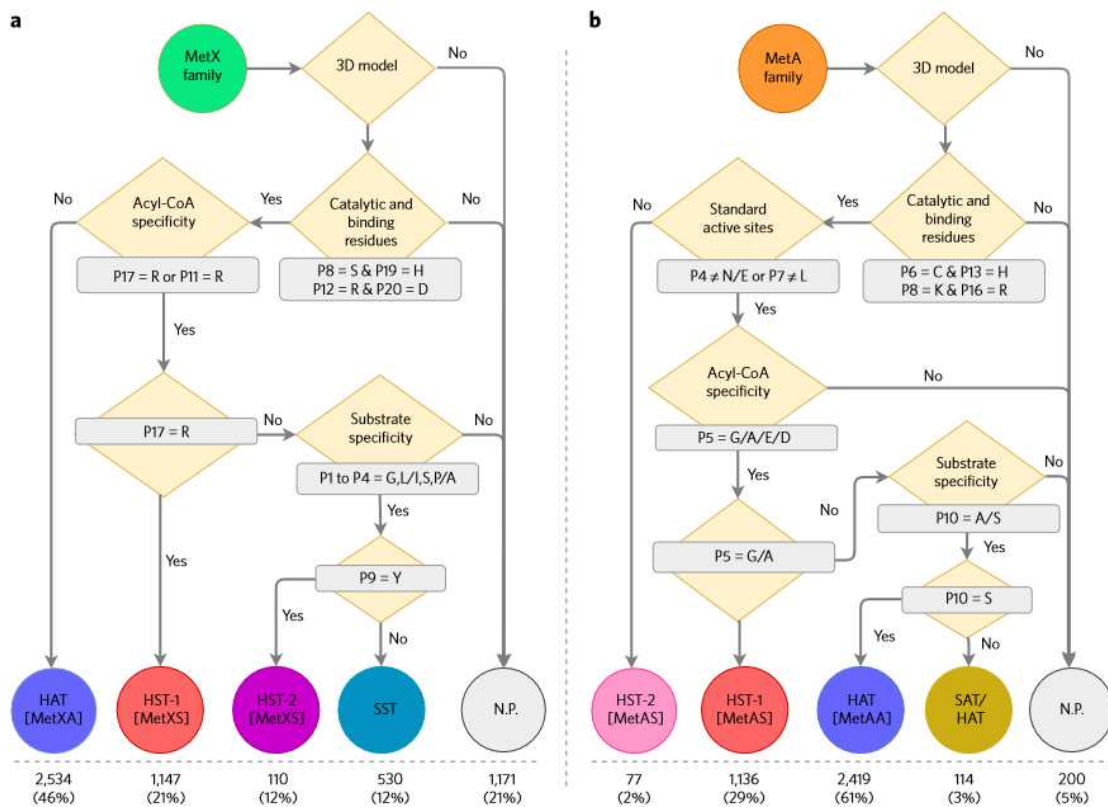


Figure 100 : Arbre de décision d'annotation des familles MetX et MetA (issu de Bastard & Perret et al., 2017)

Cet arbre de décision a été transmis à l'équipe de SwissProt qui l'a utilisé pour affiner les règles HAMAP d'annotation automatique et, dorénavant, les séquences sont annotées selon ces règles dans la base de données Uniprot. Par ailleurs cet arbre a été appliqué aux sets de référence de MetX et de MetA collectés en janvier 2016 et utilisés pour l'étude de Bastard & Perret et al. (2017). Les prédictions d'activité ont été superposées au cladogramme taxonomique du NCBI (figure 101). On peut notamment y retrouver la co-occurrence des enzymes Met2 (MetX-HAT) et Cys2 (MetX-SST) chez les champignons, et des MetX-HST2 et Cys2-like (MetX-HST2/SST homologues des Cys2 fongiques) chez les γ -protéobactéries issues majoritairement de l'ordre des Xanthomonadales, qui avait déjà été observée sans connaître alors le rôle exact de ces paralogues de MetX. On remarque également, toujours chez les procaryotes, que quelques actinobactéries possèdent également à la fois une SST et une MetX-HST ou HAT ; or, en identifiant ces quelques enzymes prédites SST, il a été remarqué qu'une d'entre elle possédait bien le motif InterPro IPR008220 commun à la famille des MetX, mais que son annotation documentée différait de cette famille. C'est à cette enzyme, nommée DcsE, que nous allons désormais nous intéresser.

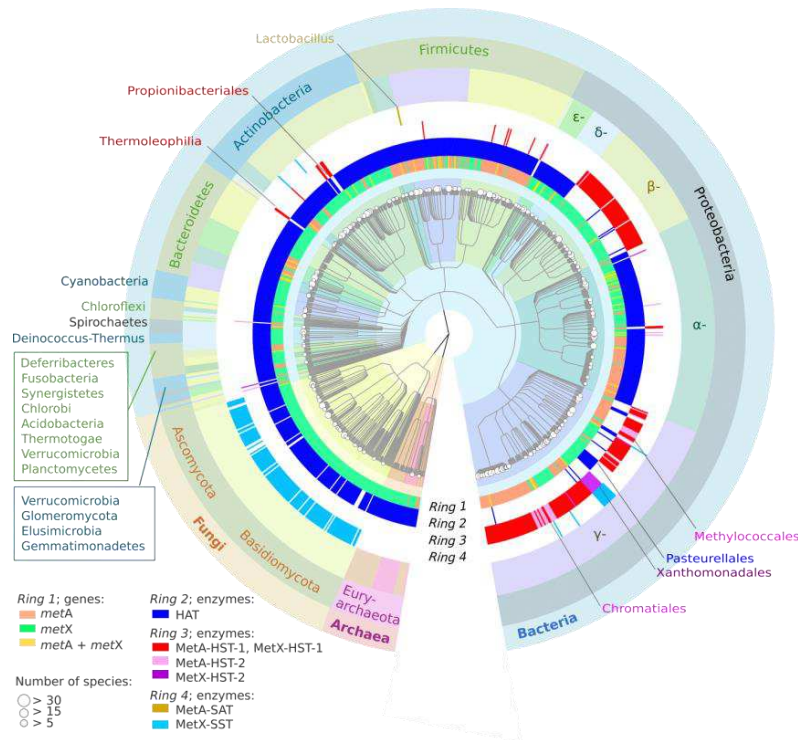


Figure 101 : Cladogramme taxonomique des MetX et MetA et répartition des activités HAT, HST et SST. Les activités HAT, HST et SST ont été déterminées à partir de l'arbre décisionnel publié par Bastard et al., 2017. Le nombre d'organismes représentés est indiqué par le rayon du cercle blanc à la fin de chaque branche de l'arbre. L'anneau 1 (le plus central) montre les gènes codants pour *metX*, *metA* ou les deux. Les enzymes HAT sont indiquées dans l'anneau 2. Les HST sont indiquées dans l'anneau 3 ; les HST-2 sont mises en évidence en violet pour MetX et en rose pour MetA. Les MetX/A à l'activité SST ou SAT sont indiquées dans l'anneau 4 (issu de Bastard & Perret et al., 2017)

3.1.9 SST impliquées dans la voie de biosynthèse de la D-cyclosérine

3.1.9.1 *DcsE* chez *Streptomyces lavendulae*

L'analyse de la réannotation des protéines Uniprot réalisée à partir de l'arbre de décision (SI dataset 4, Bastard et al., 2017) a montré que parmi les MetX prédites SST, on trouve une enzyme appelée DcsE (Uniprot ID : D2Z028) chez l'Actinobactérie *Streptomyces lavendulae*.

En 2010, Kumagai et al. ont identifié le cluster de gènes impliqué dans la voie de biosynthèse de l'antibiotique D-cyclosérine (DCS)⁴¹⁷, utilisé principalement comme traitement contre la tuberculose après échec des traitements de première ligne, et classiquement extrait de *Streptomyces garyphalus* ou *Streptomyces orchidaceus*⁴¹⁸, ou bien produit par synthèse chimique. Ce cluster contient 10 ORFs annotés *dcsA* à *dcsJ* dont l'expression hétérologue dans des souches de *Streptomyces* non productrices de DCS a permis de produire l'antibiotique, confirmant ainsi que ces gènes étaient bien impliqués dans la biosynthèse de DCS. Les auteurs ont alors proposé une voie métabolique de biosynthèse de la D-cyclosérine (figure 102). La première étape de cette voie nous intéresse

particulièrement ici car elle met en jeu l'enzyme DcsE, dont les auteurs ont montré qu'elle possède une activité L-sérine O-acétyltransférase (SAT). Cette enzyme décrite comme SAT a été cristallisée par Oda et ses collaborateurs comme nous l'avons déjà évoqué précédemment et analysée en détail pour expliquer la préférence de cette enzyme pour la L-sérine vs L-homosérine⁴⁰⁵.

DcsE partage 62 % d'identité avec Cys2_{campestris} que nous avons étudié précédemment et DcsE tout comme Cys2_{campestris} est classée dans le même groupe ASMC MetX-G3a des SST. J'ai donc entrepris de vérifier l'activité SST de DcsE afin de vérifier la prédiction et proposer une correction de la voie de biosynthèse de la D-cyclosérine.

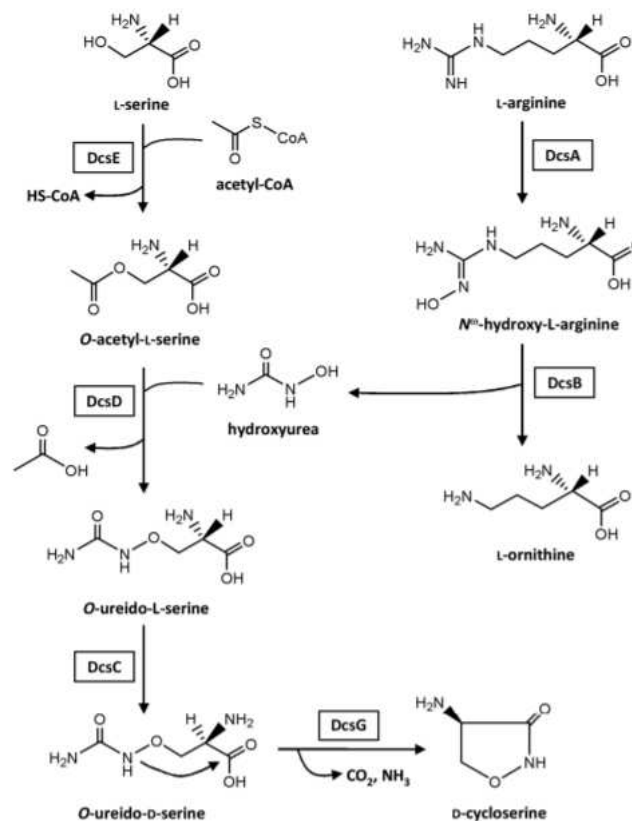


Figure 102 : Voie proposée de biosynthèse de la D-cyclosérine chez *S. lavendulae* ATCC11924 (mise à jour dans Uda et al., 2013).

DcsE de *S. lavendulae* a donc été clonée, la protéine surexprimée et purifiée au laboratoire. Les résultats des activités spécifiques SAT/SST et HAT/HST mesurées sont résumés dans le tableau 20. En accord avec les prédictions, l'activité mesurée sur L-sérine s'est révélée environ 4 fois supérieure à celle trouvée sur L-homosérine quelle que soit l'acyl-CoA utilisé, et l'activité SST 20 fois supérieure à l'activité SAT. En résumé, l'enzyme DcsE ne serait pas une SAT mais bien une SST.

DcsE	Uniprot	Activité spécifique ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)		
		Substrat	Acétyl-CoA	Succinyl-CoA
<i>S. lavendulae</i>	D2Z028	L-sérine	0,13 \pm 0,02	8,01 \pm 0,48
		L-homosérine	0,04 \pm 0,01	2,76 \pm 0,41

Tableau 20 : Comparaison des activités spécifiques SST/SAT et HST/HAT de l'enzyme MetX de *S.lavendulae* encodée par le gène *dcsE*. Dosages effectués à 25°C en présence de 5 mM d'acide aminé et 300 μM d'acy-CoA. Les valeurs correspondent à la moyenne de deux réplicas.

Cette confirmation a toutefois une implication importante pour la production de D-cyclosérine par ingénierie métabolique car les auteurs de l'étude avaient identifié comme limitante cette étape ainsi que la suivante (Kumagai et al., 2015)⁴¹⁹. En effet, l'étape suivante de la voie de biosynthèse de la D-cyclosérine est catalysée par DcsD, une *O*-ureido-L-sérine synthase, qui condense l'OAS à l'hydroxyurée. Les auteurs ont montré que DcsD a également une activité cystéine synthase⁴²⁰ qu'ils ont ensuite considéré comme parasite de la voie de biosynthèse de la D-cyclosérine⁴¹⁹. DcsD partage en outre 68 % d'identité avec CysK_{campestris} que nous avons testée précédemment et qui utilise efficacement l'OSS. Ces éléments mis ensemble, il est probable que DcsD de *S. lavendulae* produit l'*O*-ureido-L-sérine par condensation de hydroxyurée à l'OSS produit par DcsE avec relargage de succinate et non d'acétate comme prédit par la voie. Le génome de *S. levandulae* complet n'est pas disponible car seul le cluster a été séquencé, mais en utilisant dans la plateforme MicroScope la séquence de DcsD (Uniprot ID : D2Z027), le plus proche homologue se retrouve dans le cluster de gènes *Dcs* du génome de la β -protéobactérie *Roseateles terrae*, chez qui on trouve également les gènes *cysK* et *cysM* (protéines similaires à environ 40 % à DcsD), suggérant que DcsD serait dédiée à la synthèse de la D-cyclosérine alors que la biosynthèse de la L-cystéine serait réalisée sans doute via l'OAS. DcsD ne partage que 39% avec CysK_{ADP1} alors que CysK_{terrae} est plus proche de CysK_{ADP1}. Etayant cette hypothèse, on retrouve chez *R. terrae* une SAT (MicroScope ID : NIOG01_v1_130486) homologue à 53 % à CysE_{ADP1} que nous avons testée. De la même manière, on trouve également comme chez *X. campestris* un gène *metX* codant pour une MetX-HST impliquée dans la biosynthèse de la L-méthionine. Ce cluster de gènes impliqué dans la biosynthèse de la D-cyclosérine n'est pas répandu chez les *Streptomyces* et dans la nature : en mai 2018, le plus proche génome que nous avons pu trouver était celui de *R. terrae*, et comme nous le verrons ensuite, moins d'une dizaine de souches ont pu être identifiées.

3.1.9.2 Biosynthèse de la cyclosérine chez des γ et α -protéobactéries

Chez les procaryotes, les prédictions d'activité SST superposées au cladogramme taxonomique du NCBI ont montré que ces enzymes étaient majoritairement concentrées chez les Xanthomonadales (γ -protéobactéries) mais que quelques actinobactéries présentaient également le gène codant pour la synthèse de SST mais dans un contexte de synthèse d'antibiotique. Elles restent cependant très minoritaires et sont probablement le résultat de phénomènes de transfert latéral de gène. Néanmoins, l'application de la règle HAMAP MF_00296 mise à jour en 2017 suite à la publication de l'article Bastard, Perret et al. et utilisée depuis par Uniprot a permis d'identifier de nouvelles classes de protéobactéries exprimant potentiellement l'enzyme SST. Ainsi, en juin 2018, 362 protéines prokaryotes sont annotées comme "Serine *O*-succinyltransferases", c-à-d SST (figure 103). Sur ces 362

protéines, 358 sont formellement identifiées comme provenant de protéobactéries et contiennent à la fois des enzymes de type Cys2 (impliquées dans la biosynthèse de la cystéine) et des enzymes de type DcsE.

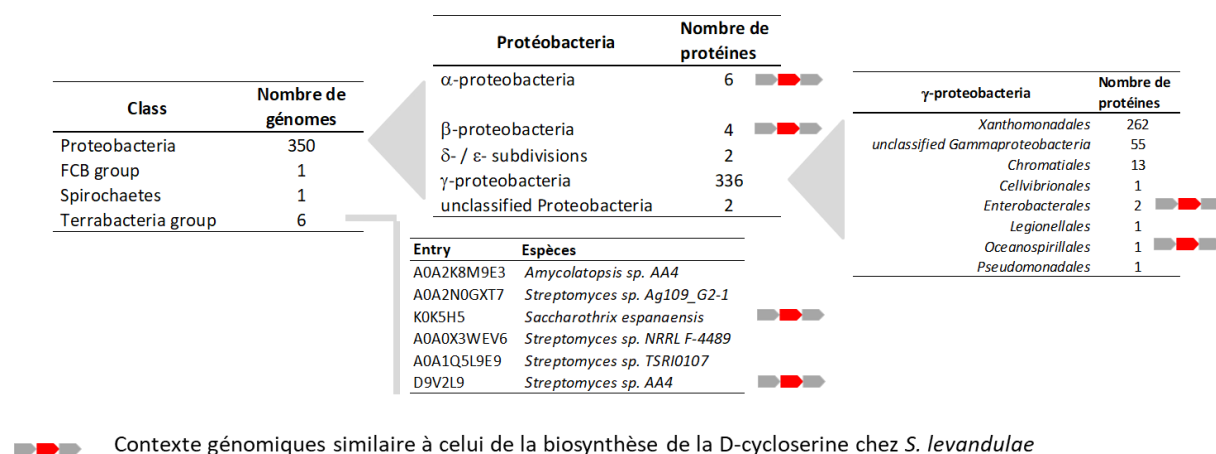


Figure 103 : Distribution chez les procaryotes des enzymes annotées comme SST par la règle HAMAP MF_00296

Afin d'identifier parmi ces SST celles qui sont trouvées dans un contexte génomique correspondant à la biosynthèse de la D-cyclosérine de *S. levandulae*, nous avons ré-actualisé l'analyse faite via MicroScope début 2018 pour bénéficier d'ajouts de nouvelles souches, notamment de quelques souches de *Streptomyces* chez lesquelles nous avons détecté des homologues de DcsE. Comme nous l'avons expliqué précédemment, nous n'avons pas pu utiliser *S. levandulae* comme génome « pivot » dans MicroScope car seule la région du cluster a été séquencée (GenBank ID : AB516431.1) et qui ne peut être intégrée à MicroScope. Nous avons donc choisi comme pivot le génome le plus proche de *S. levandulae* dans MicroScope, *Streptomyces sp. AA4 WGS NZ_ACEV* (70% d'identité entre DcsE_{levandulae} et ACEVv1_370209 (plus proche candidat de DcsE_{levandulae} par Blast dans MicroScope). Il n'y a que 7 souches de MicroScope (sur près de 9000 génomes complets intégrés) qui montrent une synténie avec *Streptomyces sp. AA4 WGS*.

Dans un premier temps, une analyse manuelle des protéobactéries a permis d'identifier au moins six bactéries qui ne sont pas des *Streptomyces* et qui possèdent ce cluster de gènes (figure 104). Ce cluster de gènes est ainsi conservé non seulement chez certaines actinobactéries comme *Saccharothrix*, mais aussi chez certaines γ-proteobactéries comme *Xenorhabdus japonica* et certaines β-protéobactéries comme *Roseateles terrae*, comme nous l'avons déjà décrit. Il est à noter cependant que chez ces dernières (genres *Xenorhabdus*, *Chromohalobacter* et *Roseateles*) il manque l'enzyme DcsC, l'O-uréido-sérine-racémase, posant la question de la synthèse de la L-cyclosérine chez ces organismes et non de D-cyclosérine. Enfin, on peut voir que les gènes *dcsIJ*, qui semblent impliqués dans la propre résistance de *S. levandulae* à la DCS qu'il produit⁴²¹, ne sont pas conservés chez les autres bactéries posant cette fois-ci la question de la résistance de ces souches à leur propre production de cyclosérine.

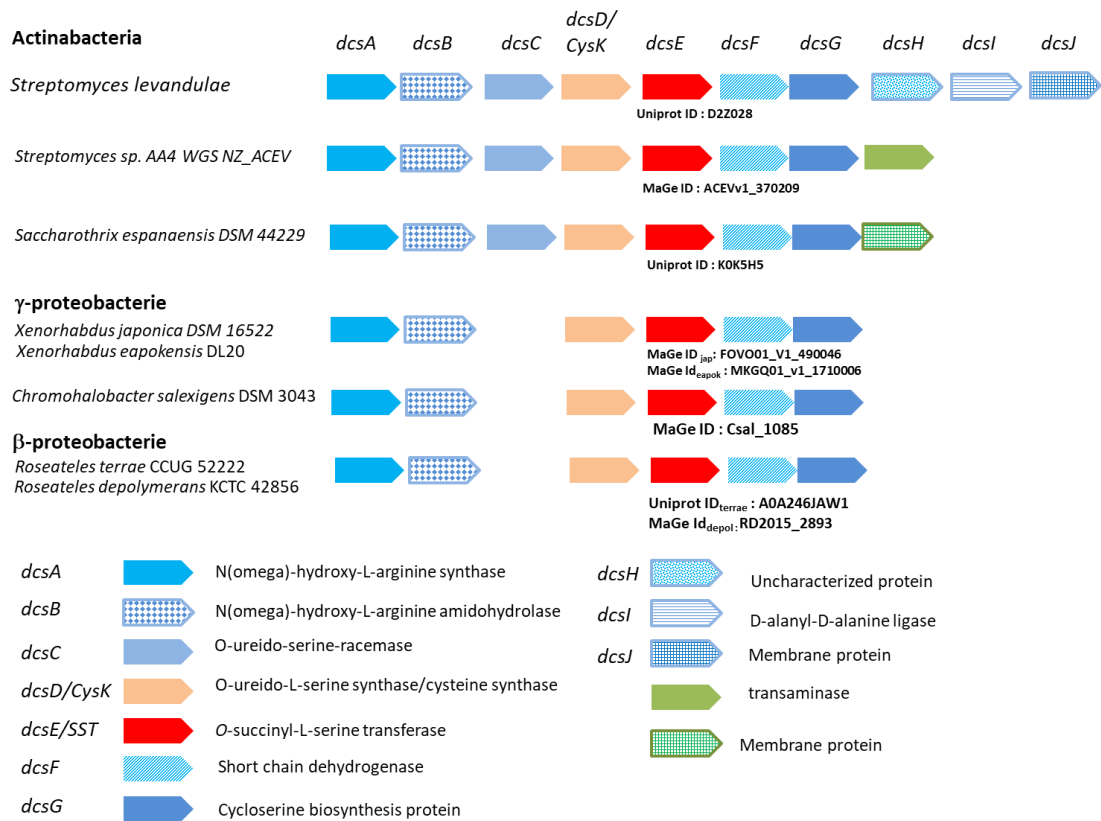


Figure 104 : Exemples de conservation en synténie du cluster de gènes *dcs* de *S. levandulae* impliqués dans la voie de biosynthèse de l'antibiotique D-cyclosérine. Analyse réalisée via la plateforme MicroScope/MaGe en utilisant le génome de *Streptomyces sp. AA4 NZ_ACEV* comme génome pivot. Les identifiants Uniprot ou MaGe des protéines DcsE ont été indiqués sous leur gène correspondant selon leur disponibilité. L'annotation des gènes a été reportée selon l'annotation réalisée sur le cluster *dcs* (Uda et al., 2013 ; Uda et al., 2015). La figure indique des variantes en fin de cluster.

En conclusion il semblerait que les SST bactériennes ne soient pas seulement impliquées dans le métabolisme primaire, c-à-d. pour la croissance et le développement des cellules, mais qu'elles aient été recrutées au cours de l'évolution pour être impliquées dans d'autres voies de biosynthèse utilisant l'*O*-acyl-L-sérine. En effet, au-delà de leur implication dans la voie de biosynthèse de L-cystéine, elles jouent aussi un rôle dans le métabolisme secondaire via la biosynthèse d'antibiotiques. Le corollaire serait que des paralogues de SAT de type CysE sont également retrouvés dans d'autres contextes métaboliques.

3.1.10 L'activité SST et le reste du vivant

Une matrice d'identité de séquences protéiques a été construite pour la famille MetX afin d'illustrer la diversité des séquences de ces MetX. L'alignement multiple de séquences de ces enzymes a montré que plusieurs enzymes MetX non fongiques ni bactériennes possédaient un pourcentage d'homologie non négligeable (~40 %) avec les SST testées (figure 105).

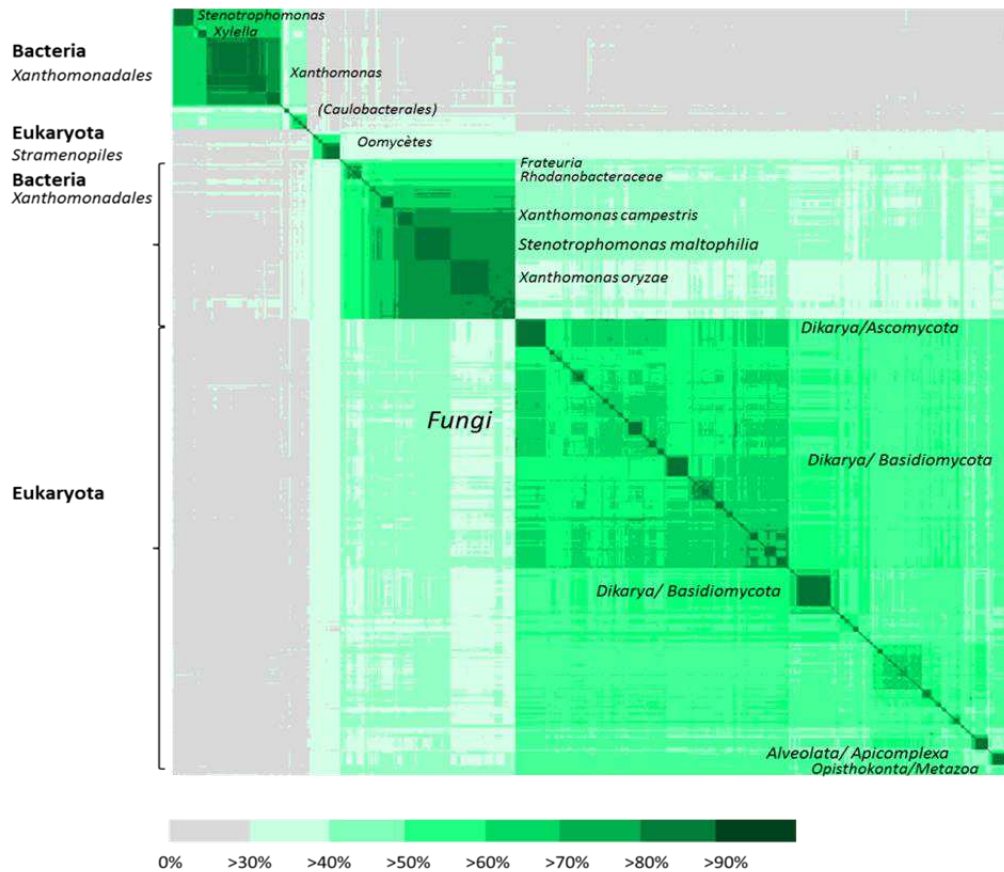


Figure 105 : Alignement de séquences multiples de l'ensemble des enzymes de la famille MetX. Alignements réalisés à l'aide du programme clustal omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Les pourcentages d'identité de matrice correspondent aux nuances de vert (issu de Bastard et al., 2017)

Afin d'identifier ces MetX, le fichier de réannotation réalisée à partir de l'arbre de décision des protéines Uniprot, en janvier 2017 (SI dataset 4, Bastard et al., 2017) a été analysé. Une vingtaine de MetX provenant d'organismes eucaryotes non Ascomycetes voire même en dehors des champignons sont prédites comme étant des STT. Ces eucaryotes plus évolués appartiennent aux embranchements des Alveolata et des Opisthokonta (tableau 21). Ces phylums regroupent notamment des organismes phytoplanctoniques, des protozoaires aquatiques, des parasites de métazoaires et des métazoaires eux-même, ou encore, des protistes flagellés vivant en pleine eau.

Lignée taxonomique		Protéine		Organisme
Phylum	Classe	Uniprot ID	Annotation - Protéine	Genre/espèce/souche
Alveolata	Apicomplexa	A0A074THL0	Homoserine O-acetyltransferase, putative (EC 2.3.1.31)	Hammondia hammondi (Parasitic protozoan)
Alveolata	Apicomplexa	F0V9Z7	Homoserine O-acetyltransferase, putative (Putative homoserine O-acetyltransferase)	Neospora caninum (strain Liverpool)
Alveolata	Apicomplexa	S7VYG2	Homoserine O-acetyltransferase, putative (Putative homoserine O-acetyltransferase) (EC 2.3.1.31)	Toxoplasma gondii
Alveolata	Apicomplexa	V4YNK0	Putative homoserine O-acetyltransferase (EC 2.3.1.31)	Toxoplasma gondii
Alveolata	Apicomplexa	A0A086KFT7	Putative homoserine O-acetyltransferase (EC 2.3.1.31)	Toxoplasma gondii FOU
Alveolata	Apicomplexa	A0A086JKP2	Putative homoserine O-acetyltransferase (EC 2.3.1.31)	Toxoplasma gondii GAB2-2007-GAL-DOM2
Alveolata	Apicomplexa	A0A086QEQ2	Putative homoserine O-acetyltransferase (EC 2.3.1.31)	Toxoplasma gondii MAS
Alveolata	Apicomplexa	A0A086KI08	Putative homoserine O-acetyltransferase (EC 2.3.1.31)	Toxoplasma gondii p89
Alveolata	Apicomplexa	A0A086LQ97	Putative homoserine O-acetyltransferase (EC 2.3.1.31)	Toxoplasma gondii RUB
Alveolata	Apicomplexa	A0A086PTY5	Putative homoserine O-acetyltransferase (EC 2.3.1.31)	Toxoplasma gondii VAND
Alveolata	Apicomplexa	A0A0F7UVG9	Homoserine O-acetyltransferase, putative	Toxoplasma gondii VEG
Alveolata	Chromerida	A0A0G4G3B6	Uncharacterized protein	Chromera velia CCMP2878
Opisthokonta	Choanoflagellida	A9URI4	Predicted protein	Monosiga brevicollis (Choanoflagellate)
Opisthokonta	Choanoflagellida	F2U0E0	Homoserine O-acetyltransferase	Salpingoeca rosetta (strain ATCC 50818 / BSB-021)
Opisthokonta	Metazoa	C3YTV6	Putative uncharacterized protein	Branchiostoma floridae (Florida lancelet) (Amphioxus)
Opisthokonta	Metazoa	H2YKH8	Uncharacterized protein	Ciona savignyi (Pacific transparent sea squirt)
Opisthokonta	Metazoa	H2YKH9	Uncharacterized protein	Ciona savignyi (Pacific transparent sea squirt)
Opisthokonta	Metazoa	K1Q6X7	Uncharacterized protein	Crassostrea gigas (Pacific oyster) (Crassostrea angulata)
Opisthokonta	Metazoa	V4AA94	Uncharacterized protein	Lottia gigantea (Giant owl limpet)
Opisthokonta	Metazoa	A0A0L8I294	Uncharacterized protein	Octopus bimaculoides (California two-spotted octopus)

Tableau 21 : MetX eucaryotes non fongiques prédites SST. Ces données sont basées sur la mise à jour d'Uniprot de janvier 2017. Données issues de SI table 4 de Bastard & Perret et al. (2017).

Ces MetX eucaryotes sont classées dans le groupe ASMC MetX-G3c avec les SST fongiques Cys2, et possèdent par ailleurs un pourcentage d'identité important avec ces enzymes, jusqu'à par exemple 55 % d'identité entre la MetX de *Ciona savignyi* et l'enzyme de l'Ascomycète Cys2_{pombe}. Afin de tester expérimentalement l'activité SST de ces MetX autres que les champignons ascomycètes, nous avons choisi quelques représentants du groupe G3c. Celui-ci est comme nous l'avons évoqué au début du chapitre composé à 95% de fungi, dont le groupe des Ascomycètes est l'embranchement le plus représenté (tableau 22), et qui avait été choisi pour vérifier l'activité STT.

Embranchements	Nombre de MetX-SST
<i>Ascomycota</i>	288
<i>Basidiomycota</i>	74
<i>Mucoromycotina</i>	7
<i>Blastocladiomycetes</i>	1
<i>Chytridiomycetes</i>	1

Tableau 22 : Distribution des embranchements de champignons ayant un gène *metX* prédits pour coder pour une SST (données issues de l'analyse du dataset 4 de Bastard, Perret et al., 2017).

Le deuxième embranchement de champignons le plus représenté dans G3c est celui des Basidiomycètes auquel appartient *Saccharomyces cerevisiae*. La voie de biosynthèse de la L-cystéine a

été étudiée chez *S. cerevisiae*, souvent modèle pour les levures, chez qui il a été démontré qu'elle est réalisée par la voie de transulfuration réverse uniquement à partir de la L-méthionine ou de la L-homocystéine¹⁶ et pas à partir de la L-sérine (d'ailleurs il n'y a pas de gène codant pour une SAT dans le génome). La MetX prédite comme SST de la levure *Pseudozyma antarctica*, plus connue sous le nom de *Candida antarctica*, a ainsi été sélectionnée (MetX_{antarctica} ; Uniprot ID : A0A081CL69) pour être testée.

Dans le groupe G3c on trouve ensuite les apicomplexés (ou sporozoaires) et les Métazoaires. Nous avons sélectionné un représentant des principaux embranchements non encore explorés :

- Pour s'éloigner un peu des champignons et choisir un organisme plus évolué, la MetX de *Phytophthora parasitica* (MetX_{parasitica} ; Uniprot ID : W2JD21) a été choisie. *P. parasitica* est un organisme phytopathogène de la classe des Oomycètes, souvent décrit comme étant Stramenopiles, un pseudo-fungi. Au cours de l'analyse globale de la famille MetX, 39 MetX d'Oomycètes sur 41 ont pu être modélisées à partir des structures procaryotes de la PDB (SI Dataset 4 ; Bastard et al., 2017) et la triade catalytique identifiée. Parmi ceux-ci 18 ont été prédits comme étant des MetX avec une activité HAT. Par contre, pour les 21 autres MetX seule l'usage de l'acyl-coA (succinyl-CoA) a pu être prédit par l'arbre de décision mais la spécificité de substrat n'a pas pu être prédite (ni HST ni SST). MetX_{parasitica} choisi partage 36 % d'identité avec MetX-SST_{campestris} et 32 % avec Cys2_{pombe}.
- Parmi les 14 MetX protozoaires du phylum Alvéota (majoritairement de la classe des Apicomplexa) modélisées à partir des MetX procaryotes (14 sur 15 MetX), toutes sont prédites pour être des succinyl-transférases dont 12 prédites SST. Pour les autres, il n'a pas de prédiction de substrat. La MetX (MetX_{gondii} ; Uniprot ID : V4YNK0) de l'organisme intracellulaire *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa) a ainsi été sélectionnée pour vérifier expérimentalement son activité SST.
- Enfin, 10 MetX de Métazoaires avaient pu être modélisés dont 9 prédits comme succinyl-transférases. Parmi les 6 protéines prédites SST, celle (MetX_{savignyi} ; Uniprot ID : H2YKH8) de *Ciona savignyi* a été choisie pour être testée. Cette protéine est annotée comme « Uncharacterized protein » dans Uniprot mais elle partage le motif Interpro IPR008220 des MetX. MetX_{savignyi} partage 40 % d'identité avec MetX-SST_{campestris} et Cys2_{pombe}.

Ces quatre gènes ont été synthétisés par Sigma avec une optimisation des codons pour l'expression chez *E. coli*, puis les protéines ont été surexprimées et purifiées au laboratoire. Seules MetX_{antarctica} et MetX_{savignyi} ont pu être correctement purifiées et testées biochimiquement (tableau 23). Une activité SST a pu être mesurée pour ces deux enzymes eucaryotes qui dans les deux cas est l'activité principale dans nos conditions. MetX_{antarctica} est assez promiscuitaire car même si elle utilise préférentiellement le succinyl-CoA, on mesure une activité en présence d'acétyl-CoA également. MetX_{antarctica} montre une activité SST la plus forte enregistrée parmi toutes les SST testées dans l'étude avec une conversion de plus de 5 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg d'enzyme}^{-1}$ (18 fois l'activité HST mesurée). Une recherche dans Uniprot permet de trouver qu'il existe une cystéine synthase dans le génome de *Candida antarctica* suggérant en effet que la biosynthèse de la L-cystéine est réalisée comme nous l'avons montrée chez *S. pombe* via l'OSS. En 2018, le premier Basidiomycète, *Cryptococcus neoformans*, a été décrit comme ne réalisant pas la voie de transulfuration réverse mais réalisant

plutôt la synthèse de la L-cystéine via l'acétyl-L-sérine synthétisée par Cys2⁴²² par analogie avec *S. pombe* (locus tag CNE02740 correspondant à l'Uniprot ID : Q5KGQ3). Cependant, cet article ne cite pas et ne prend pas en compte l'article Bastard et al., 2017 paru un an plus tôt et se trompe sur le produit formé par Cys2 de *C. neoformans* (l'OSS). Ces éléments suggèrent fortement que, compte tenu du fait que l'on trouve une MetX prédite SST chez 71% des champignons, la biosynthèse de la L-cystéine n'est pas réalisée par la voie de transsulfuration réverse comme le modèle *S. cerevisiae* mais plutôt comme chez *S. pombe* via la sulfhydrylation de l'OSS.

Organismes	MetX - Uniprot ID	Activité spécifique (nmole.min ⁻¹ .mg ⁻¹)			
		HAT	HST	SAT	SST
<i>Ciona savignyi</i>	H2YKH8	0	83,5 ± 16,9	0	243,5 ± 25,5
<i>Candida antarctica</i>	AOA081CL69	75,5 ± 44,1	282,7 ± 5,5	189,3 ± 16,2	5048,7 ± 827,0

Tableau 23 : Comparaison des activités spécifiques HAT/HST et SAT/SST de MetX de la levure *Candida antarctica* (MetX_{antarctica}) et de la Cione (MetX_{savignyi}). Dosages effectués à 25 °C en présence de 5 mM de L-homosérine ou L-sérine et 300 µM d'acyl-CoA. Les valeurs correspondent à la moyenne de deux réplicas.

La MetX_{savignyi} de la Cione ne semble quant à elle n'utiliser que le succinyl-CoA. L'activité SST mesurée est par ailleurs trois fois supérieure à l'activité HST. *C. savignyi* est le premier organisme eucaryote non fongique pour lequel une enzyme à l'activité SST a été confirmée. Selon la base de donnée KEGG, ce génome serait capable de faire de la L-cystéine grâce à une protéine prédite comme étant une cystéine synthase (CysK_{savignyi} ; Uniprot ID : AOA1W2WJT8) mais aucune SAT ne semble avoir été identifiée renforçant l'hypothèse que la L-cystéine est réalisée via l'OSS chez ce métazoaire. Renforçant cette hypothèse, on peut observer que CysK_{savignyi} partage 54 % d'identité avec CysK_{pombe} que nous avons testée. *C. savignyi* est une ascidie, animal marin de l'embranchement des tuniciers. Cette espèce, originaire des eaux marines peu profondes autour du Japon, s'est également étendue à la côte ouest de l'Amérique du Nord. Comme l'espèce étroitement apparentée *Ciona intestinalis*, elle est considérée comme nuisible car elle forme des agrégats denses sur des structures artificielles telles que les coques de bateaux et les radeaux d'aquaculture. C'est aussi un organisme d'intérêt dans l'étude du développement et de l'évolution des chordés. Son génome est hautement polymorphe ce qui rend l'assemblage difficile. Une recherche par homologie de séquence dans UniprotKB à partir de SST_{savignyi} montre qu'elle partage 65 % avec MetX du branchiopode *Branchiostoma floridae* ou lancelet de Floride (Uniprot ID : C3YTV6), 62 % avec MetX de l'huitre japonaise *Crassostrea gigas* (Uniprot ID : K1Q6X7), ou même 62 % avec MetX de la pieuvre à deux points de Californier *Octopus bimaculoides* (Uniprot ID : AOAOL8I294) ou celle du mollusque de type patelle du pacifique, *Lottia gigantea* (Uniprot ID : V4AA94). Il est probable que ces MetX soient des SST également. Il semble que le gène codant pour cette SST eucaryote se soit largement répandu à travers différents eucaryotes vivant dans l'océan Pacifique posant la question d'un possible transfert horizontal de gènes entre eucaryotes et procaryotes marins notamment.

3.2 Projet ADP1

Avant mon arrivée au laboratoire, il avait été montré qu'ADP1 pouvait utiliser la L-méthionine comme source de soufre. L'équipe d'annotateurs du Genoscope/LabGeM n'avait pas, au début des années 2000, identifié de voie de recyclage de la L-méthionine chez cette bactérie. Personne au laboratoire n'avait travaillé sur cette problématique avant mon arrivée et nous avons donc entrepris dans un premier temps de faire une étude bibliographique approfondie pour essayer d'identifier l'une de ces voies. Cette étude est celle présentée en introduction du manuscrit. Malheureusement, ni de méthionine-γ-lyase (MGL), qui aurait pu suggérer une voie passant par le méthanethiol comme cela a été identifié chez une autre Pseudomonadale (*Pseudomonas putida*), ni les gènes impliqués dans le cycle du MTA n'ont pu être identifiés, laissant alors l'hypothèse d'une voie de transsulfuration réverse via la cystathionine (CTT), telle que décrite chez *P. aeruginosa*¹³⁷, plausible.

3.2.1 Recherche des enzymes impliquées dans la transsulfuration réverse

3.2.1.1 Identification des enzymes à PLP d'ADP1

Les enzymes impliquées dans la transsulfuration réverse sont souvent des paralogues des enzymes impliquées dans le métabolisme du soufre. Par exemple, chez *Bacillus subtilis* ou *Pseudomonas aeruginosa*, la CTT-γ lyase (CGL) est homologue à MetY, MetB ou MetC (figure 106).

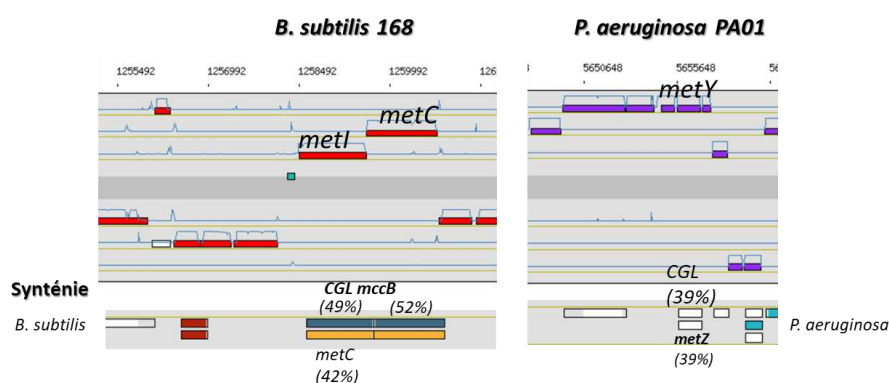


Figure 106 : Chez *B. subtilis* ou *P. aeruginosa*, la CGL est homologue aux enzymes impliquées dans la biosynthèse de la L-méthionine.

Une analyse via MicroScope/MaGe nous a montré que nous ne trouvons pas d'homologue aux trois enzymes impliquées dans le métabolisme de la méthionine MetZ, MetY et MetC dans le génome d'ADP1. Partant du fait que les enzymes des voies de sulfurylation (transsulfuration et sulfhydrylation) sont toutes des enzymes à PLP et qu'elles se partagent en deux groupes structuraux distincts (cf. section 1.2.2.3), nous avons entrepris d'identifier chez ADP1 l'ensemble des protéines à PLP appartenant à l'un de ces deux groupes. Pour cela, nous avons identifié les familles et domaines communs des protéines MetY, MetZ et MetC d'une part, et CysK et CysM d'autre part. Afin de récupérer le maximum de candidats PLP-dépendants, nous avons choisis pour les « Met » l'entrée InterPro commune IPR015424, et pour les « Cys » le domaine commun IPR001926 pour les raisons suivantes :

- IPR015424, « Pyridoxal phosphate-dependent transferase », est une superfamille d'homologues qui comprend les protéines contenant une région majeure des transférases à PLP, avec une structure typique composée de trois couches alpha/bêta/alpha (avec des feuilletts bêta mixtes à 7 brins, parallèles/antiparallèles). Ce domaine peut être trouvé chez les enzymes analogues aux aspartate aminotransférases (AAT-like), les β -lyases (comme la tryptophanase ou la tyrosine phénol lyase), les décarboxylases à pyridoxal, les analogues aux cystathionine synthases (dont les MGL mais aussi les cystéine désulfurases, comme IscS), les enzymes de type GABA-aminotransférase, ou encore l'ornithine décarboxylase. Pour MetY, MetZ et MetC, cette entrée co-apparaît avec l'IPR000277, soit la famille « Cys/Met metabolism, pyridoxal phosphate-dependent enzyme », qui ne permet pas de recouvrir autant de protéines que IPR015424.

- IPR001926, représentant le domaine « Pyridoxal-phosphate dependent enzyme » d'un groupe de la superfamille des enzymes à PLP représentée par la sous-unité bêta de la tryptophane synthase (IPR036052)¹⁴⁶. Ce groupe contient des protéines diverses, dont la thréonine déshydratase, la cystéine synthase, la désaminase PLP-dépendante, etc... La superfamille IPR036052 ne permettait pas quant à elle d'obtenir autant de candidats qu'avec le domaine IPR001926.

L'identification des protéines partageant l'un de ces deux identifiants InterPro a été réalisée via la plateforme MicroScope/MaGe. Cela a permis d'obtenir une liste de 35 enzymes PLP-dépendantes, présentées dans le tableau 24. On trouve parmi elles des enzymes potentiellement reliées au métabolisme du soufre en plus des 5 enzymes déjà précisées précédemment. Il s'agit de putatives cystéine désulfurases (IscS et Csd) et désulfhydrases (DcyD), ainsi qu'une putative méthionine aminotransférase (ACIAD3553).

Label	Uniprot ID	Product	Gene name	IPR id
ACIAD0095	Q6FFT3	perosamine synthetase (WeeJ)	WeeJ	IPR015424
ACIAD0112	Q6FFR7	tyrosine aminotransferase, tyrosine repressible, PLP-dependent	TyrB	IPR015424
ACIAD0263	Q6FFC9	threonine synthase, pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme	thrC	IPR001926
ACIAD0636	Q6FEF1	tryptophan synthase beta chain	trpB	IPR001926
ACIAD0664	Q6FEC7	histidinol-phosphate aminotransferase	HisC	IPR015424
ACIAD0753	Q6FE50	putative D-cysteine desulfhydrase (DcyD)	DcyD?	IPR001926
ACIAD0856	Q6FDV2	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononoate aminotransferase	BioA	IPR015424
ACIAD0857	Q6FDV1	8-amino-7-oxononoate synthase	BioF	IPR015424
ACIAD1048	Q6FDC1	D-serine deaminase (dehydratase)	DsdA	IPR001926
ACIAD1201	Q6FCY1	glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	HemL	IPR015424
ACIAD1210	Q6FCX2	diaminobutyrate--2-oxoglutarate aminotransferase (L-diaminobutyric acid transaminase) (Diaminobutyrate transaminase) (DABA aminotransferase) (DABA-AT) (L-2,4-diaminobutyrate:2-ketoglutarate 4- aminotransferase)	Dat	IPR015424
ACIAD1211	Q6FCX1	L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase	Ddc	IPR015424
ACIAD1231	Q6FCV3	acetylornithine aminotransferase	ArgD	IPR015424
ACIAD1284	Q6FCQ2	Succinylornithine transaminase	AstC	IPR015424
ACIAD1357	Q3V7H0	Threonine dehydratase biosynthetic (Threonine deaminase)	IlvA/tdcB	IPR001926
ACIAD1404	Q6FCE2	cysteine desulfurase used in synthesis of Fe-S cluster (tRNA 4-thiouridine sulfurtransferase)	IscS	IPR015424
ACIAD1452	Q6FC96	putative aminotransferase		IPR015424
ACIAD1582	Q6FBX9	putative cysteine desulfurase 1 (Csd)	Csd	IPR015424
ACIAD1662	Q6FBQ5	subunit of cysteine synthase A and O-acetylserine sulfhydrolase A, PLP-dependent enzyme	cysK	IPR001926
ACIAD1897	Q6FB37	putative transcriptional regulator (GntR family)		IPR015424
ACIAD2032	Q6FAQ9	putative bifunctional protein [Includes: putative transcriptional regulator (GntR family); putative amino transferase]		IPR015424
ACIAD2080	Q6FAM4	succinyldiaminopimelate transaminase	dapC	IPR015424
ACIAD2087	Q6FAL7	glutamate-pyruvate aminotransferase	AlaA	IPR015424
ACIAD2255	Q6FA66	serine hydroxymethyltransferase	GlyA	IPR015424
ACIAD2314	Q6FA16	o-acylhomoserine sulfhydrylase (MetZ)	MetZ	IPR015424/IPR000277
ACIAD2574	Q6F9C7	aspartate aminotransferase A	AspC	IPR015424
ACIAD2647	Q6F961	3-phosphoserine aminotransferase	SerC	IPR015424
ACIAD3071	Q6F845	cysteine synthase B (O-acetylserine sulfhydrolase B)	cysM	IPR001926
ACIAD3222	Q6F7Q9	putative cystathionine beta-lyase, PLP-dependent (beta-cystathionase) (MetC)	MetC	IPR015424/IPR000277
ACIAD3341	Q6F7F5	putative arginine/lysine/ornithine decarboxylase		IPR015424
ACIAD3382	Q6F7B9	homocysteine synthase (MetY)	MetY	IPR015424/IPR000277
ACIAD3446	Q6F767	4-aminobutyrate aminotransferase, PLP-dependent	GabT	IPR015424
ACIAD3447	Q6F766	putative transcriptional regulator (GntR family)		IPR015424
ACIAD3553	Q6F6X0	putative methionine aminotransferase, PLP-dependent		IPR015424
ACIAD3613	Q6F6R8	putative transcriptional regulator		IPR015424

Tableau 24 : Liste des enzymes identifiées comme PLP-dépendantes chez ADP1 et partageant les signatures IPR001926 et IPR015424. Les enzymes sont classées par ACIAD. MetZ, MetY et MetC impliquées dans la biosynthèse de la L-méthionine sont surlignées en orange. CysK et CysM, impliquées dans la biosynthèse de la L-cystéine, en violet.

Les gènes de ces enzymes étant disponibles dans la collection de l'ORFéome d'ADP1, elles ont été induites en cultures individuelles et en microplaque 96 puits par IPTG dans la souche commerciale d'expression d'*E. coli* BL21 (DE3) Star™. Après induction, les cultures ont été lysées et les enzymes purifiées. Les 5 enzymes décrites en introduction, dont la promiscuité a déjà été démontrée chez d'autres organismes et pouvant être candidates à l'une ou l'autre des réactions, ont été purifiées individuellement en quantité plus importantes via l'utilisation de mini-colonnes QIAprep (QIAGEN®). Les plaques 96 puits ont quant elle été purifiées à l'aide du kit HisLink™ 96. Les purifications en plaque ont été réalisées trois fois au cours de ma thèse et il s'est avéré que 9 des 35 enzymes à PLP n'ont soit jamais pu être purifiées malgré une tentative en culture individuelle (TrpB, CsD, ACIAD3613, ACIAD3447, BioF, AstC/ArgD), soit été mal induites (DcyD, BioA, ACIAD1897, ACIAD2032). Par contre, l'ACIAD3553, une putative méthionine aminotransférase dont l'induction s'est avérée curieusement toujours plus problématique en plaque a pu être purifiée en tube individuel. Enfin, deux protéines supplémentaires, les transaminases DapC et SerC, n'ont été obtenues qu'en très faible quantité d'après l'analyse des gels SDS-PAGE et les mesures de Bradford.

Ces données sont importantes pour ce type de projet car ces candidats n'ont *de facto* pas été explorés expérimentalement lorsque les tests expérimentaux effectués en plaque nécessitaient la manipulation d'enzymes purifiées et non de lysat. Par la suite, ces protéines seront appelées par leur nom attribué lors de l'annotation fonctionnelle, ou par leur ACIAD si aucun nom ne leur a été attribué.

3.2.1.2 Tests d'activité CTT β -synthase (CBS)

La première étape pour laquelle nous avons recherché un candidat est la synthèse de CTT à partir de la L-homocystéine, via l'activité CBS (figure 107). La biosynthèse de la CTT à partir de l'homocystéine nécessite tel que nous l'avons exposé précédemment une coupure au niveau du C β de la L-sérine, comme avec MtcB de *Klebsiella pneumoniae* (voie 1a), ou bien de l'O-acétyl-L-sérine (OAS) comme avec MccA de *B. subtilis* (voie 1b) avant le transfert de la partie amino-acide sur le groupement thiol. En l'absence d'homocystéine, cette β -élimination s'accompagne toujours de la libération de pyruvate mais aussi d'eau ou d'acétate suivant le substrat. Cette β -élimination peut donc être dosée par spectrophotométrie en utilisant un test couplé (figure 108) avec la lactate déshydrogénase (LDH), qui permet de suivre la conversion du pyruvate en lactate à 340 nm via la consommation simultanée de NADH. Nous ne pouvions facilement tester l'activité CBS directement en spectrophotométrie et nous ne pouvions pas, à l'époque de cette étude, avoir de créneau suffisant pour une analyse LC-MS pour toutes les enzymes à PLP d'ADP1. Nous avons donc décidé de sélectionner d'abord des candidats parmi les enzymes à PLP capables de réaliser la β -élimination de la L-sérine ou de l'OAS, puis de tester ces enzymes en LC-MS pour la formation de CTT.

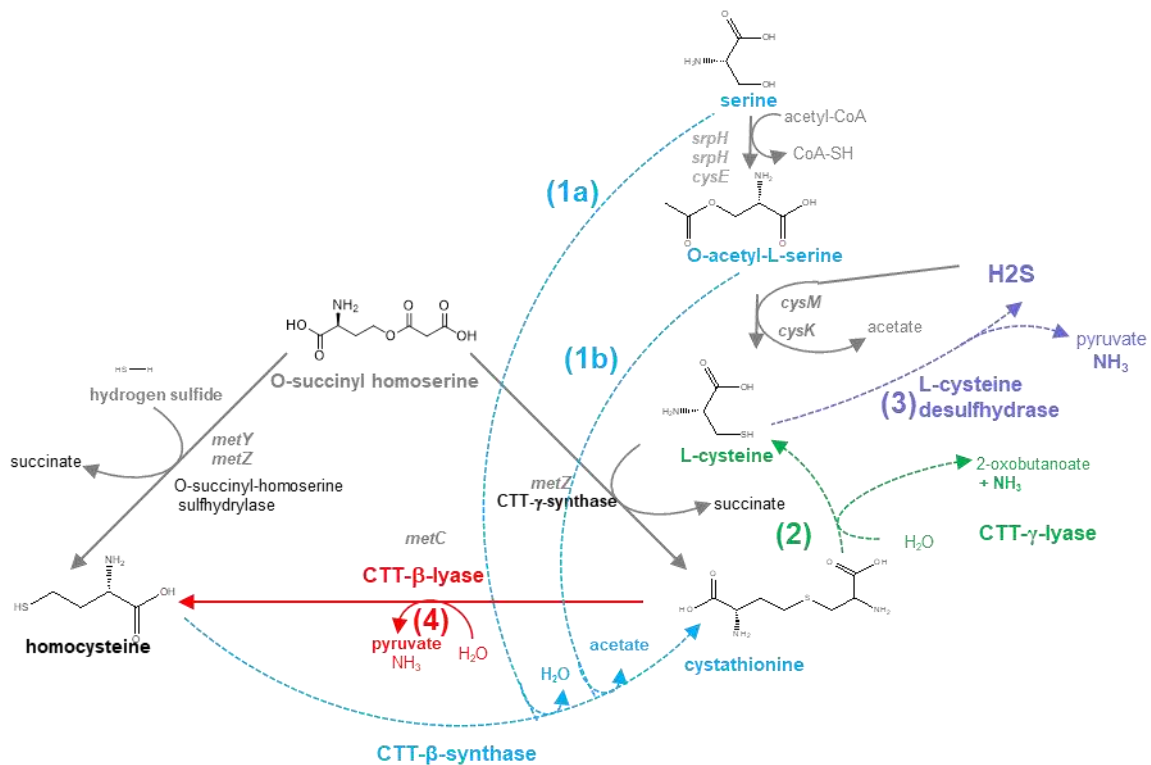


Figure 107 : Voies de transsulfuration réverse recherchées chez ADP1. En bleu, l'activité CTT β -synthase à partir de l'homocystéine avec la L-sérine (1a) comme avec MtcB de *Klebsiella pneumoniae*, ou avec l'O-acétyl-L-sérine (1b) comme avec Mcca de *B. subtilis*. En vert, réaction de CTT γ -lyase à partir de la CTT (2). En violet, activité L-cystéine désulfhydrase aboutissant à l'H₂S à partir de L-cystéine (3). En rouge, activité CTT- β -lyase à partir de la CTT (4). Les co-produits suivis par les tests couplés LDH ou GDH sont marqués en gras.

L'activité β -lyase a donc été testée sur L-sérine et OAS. Quatre enzymes à PLP se sont avérées actives, soit à la fois sur L-sérine et OAS (MetC), soit seulement sur OAS (CysM, CysK et ACIAD3553). MetC, CysM et l'ACIAD3553 ayant présenté les activités les plus fortes, ces trois enzymes ont été choisies afin de tenter de détecter en LC-MS la biosynthèse de la cystathionine.

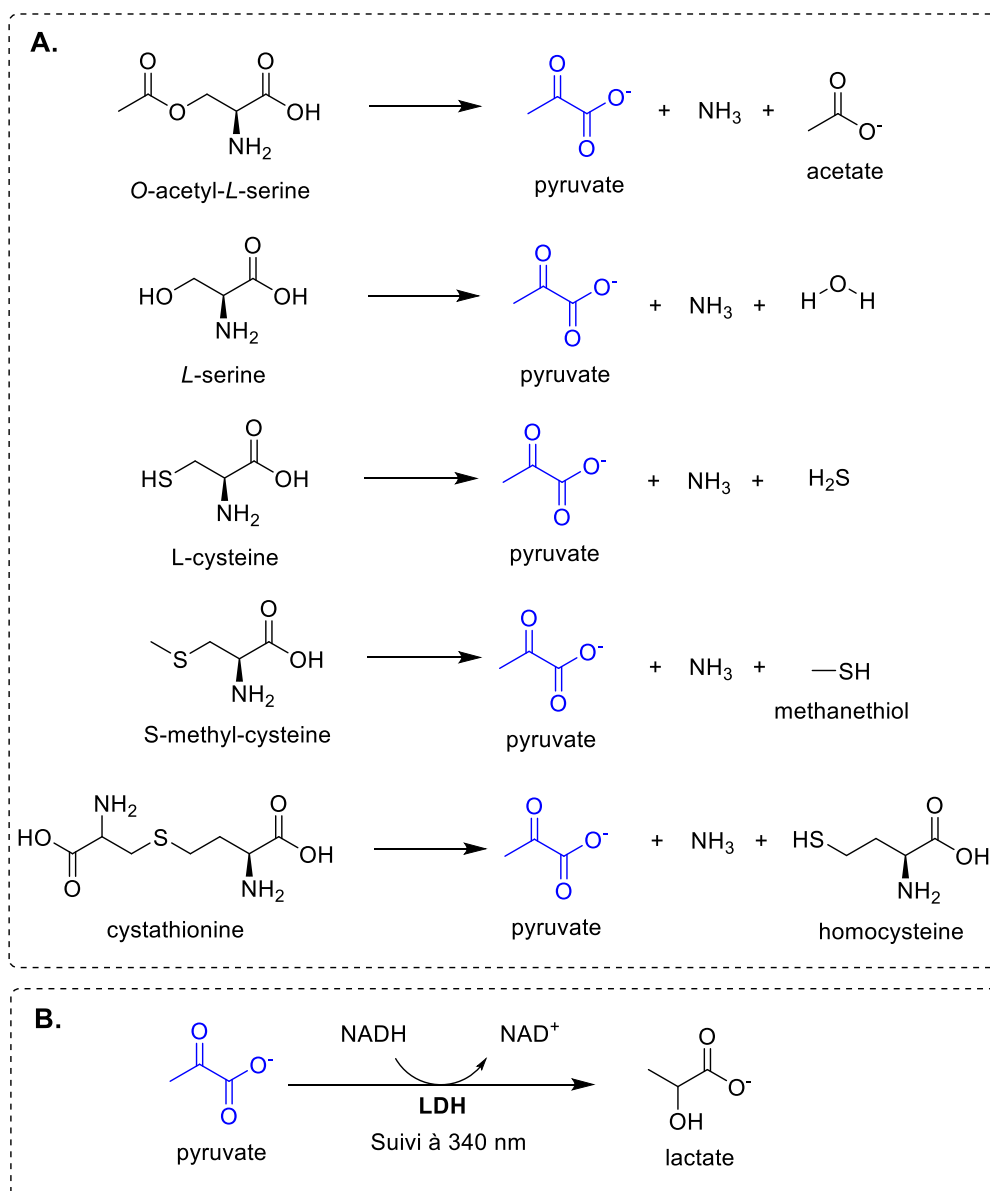


Figure 108 : Réaction de β -élimination sur différentes molécules sulfurées et dosage du pyruvate via le test couplé à la LDH. A. Exemples de réactions de β -élimination catalysées par des enzymes β -lyases. **B.** Réaction de couplée pour le dosage du pyruvate à 340 nm.

Les enzymes candidates ont ainsi été incubées 20 min en présence des substrats DL-homocystéine et de L-sérine d'une part, ou d'OAS d'autre part. Puis les milieux réactionnels ont été filtrés et dilués au quart dans la phase mobile avant d'être injectés. De la L-CTT commerciale a été utilisée comme standard par Ekaterina pour mettre au point la méthode. La CTT a été détectée uniquement dans l'échantillon issu de la réaction entre la DL-homocystéine et l'OAS, catalysée par CysM (figure 109). Aucune L-CTT n'a pu être détectée dans les milieux réactionnels contenant de la DL-homocystéine et de la L-sérine, quelle que soit l'enzyme testée.

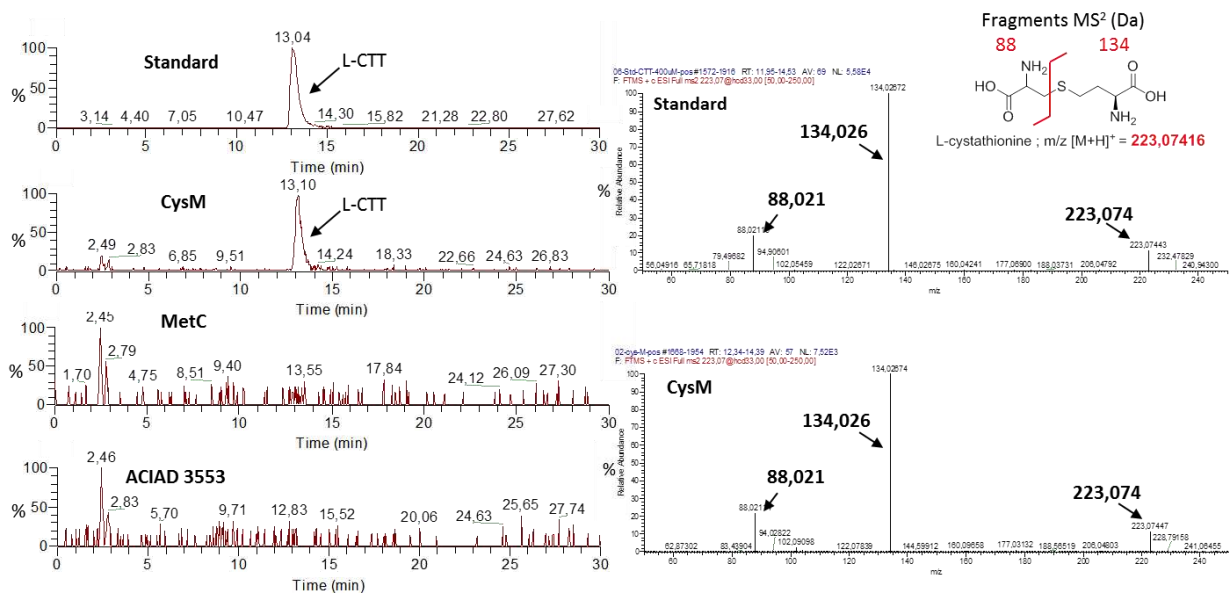


Figure 109 : Mise en évidence de la synthèse enzymatique de L-cystathionine en présence de DL-homocystéine et d'OAS. À gauche, les chromatogrammes des réactions enzymatiques réalisées en duplicas. À droite, les spectres de fragmentation MS² en mode positif de l'ion [M+H]⁺ m/z = 223,07416 (cystathionine protonée) réalisée par HCD sur l'appareil Orbitrap Elite™.

Ces analyses LC-MS valident ainsi le fait qu'une cystéine synthase d'ADP1 peut catalyser la première étape de la voie de transsulfuration réversible *in vitro* chez ADP1, comme cela a été montré chez *Helicobacter pylori* SS1⁴²³, chez qui CysK (et non CysM) catalyse cette étape. Cependant, via MicroScope/MaGe, on peut noter que le génome des espèces de *H. pylori* n'ont qu'une seule cystéine synthase annotée CysK mais que cette dernière a autant de pourcentage d'identité avec CysK et CysM d'ADP1 (37% environ). CysM_{ADP1}, comme MccA de *B. subtilis*, a une activité CBS en utilisant l'OAS et non la L-sérine.

CysK_{ADP1} n'a pas fait partie de la première vague d'enzymes candidates à la vérification en LC-MS compte tenu des faibles activités de β-élimination mesurées par spectrophotométrie. Cependant, au vu des résultats pour CysM_{ADP1}, l'activité CBS devrait prochainement être testée au laboratoire avec CysK_{ADP1}.

À l'image d'autres CysK décrites dans la littérature comme très promiscuitaires, comme CysK_{coli} qui possède également une activité cystéine désulfhydrase (cf. introduction), CysK_{ADP1} et CysM_{ADP1} ont donc été testées sur cystéine via la réaction couplée à la LDH décrite précédemment (voie 3, figure 107 ci-dessus). Cependant, aucune activité cystéine désulfhydrase n'a pu être détectée pour aucune des deux cystéine synthases. L'activité cystéine désulfhydrase a aussi été testée sur les deux autres enzymes candidates pour l'activité CBS et il s'est avéré que MetC, en plus d'être une CBL, catalyse également cette activité à hauteur de 416 nmol.min⁻¹.mg⁻¹ (pour 1 mM de substrat). Sa promiscuité de substrat a par la suite été explorée, et une activité β-lyase a également pu être mesurée sur 1 mM de S-méthyl-cystéine (2463 nmol.min⁻¹.mg⁻¹). Des résultats préliminaires montrent également une forte activité β-lyase de MetC_{ADP1} sur L-cystine et DL-lanthionine.

3.2.1.3 Tests d'activité CTT γ -lyase (CGL)

Plusieurs techniques d'analyse ont été abordées afin de rechercher chez ADP1 une potentielle activité cystathionine γ -lyase (CGL), deuxième étape de la voie de transsulfuration réverse, lors de laquelle la CTT est convertie en cystéine (figure 107, voie 2). La première approche fut de détecter indirectement l'ammoniac également relargué lors de cette réaction (figure 110) via un autre test couplé adapté au format microplaque 96 puits. Cette fois-ci, c'est la glutamate déshydrogénase (GDH) qui a été choisie, permettant de suivre la consommation de NADH par spectrophotométrie à 340 nm. Ce test s'effectue en deux temps : d'abord, une première réaction (1a) est effectuée sur une nuit avec les enzymes à PLP purifiées en plaque sur L-CTT comme substrat ; puis dans un second temps, le dosage du NH_3 produit lors de la première réaction est réalisé via le test couplé à la GDH (2). La GDH permet de catalyser la réaction de substitution de la fonction cétone d'un α -cétoacide par une amine primaire, en transférant l'azote de l'ammoniac relargué lors de la réaction (1a) sur l' α -cétoglutarate, avec comme co-facteur le NADH converti en NAD^+ . Cependant, ce test n'est pas spécifique de la réaction CGL car du NH_3 pourrait également être libéré en présence de la L-CTT si l'une des enzymes testées se révélait être une CBL (réaction 1b), c.-à-d. une isoforme de MetC. Cette éventualité n'est en effet pas à exclure car le gène *metC* n'est pas essentiel sur sulfate⁷³. Les activités CGL et CBL peuvent alors être discriminées en effectuant un criblage des mêmes enzymes avec le test couplé à la LDH : si une activité est détectée lors des deux tests, alors l'enzyme est une CBL et non une CGL.

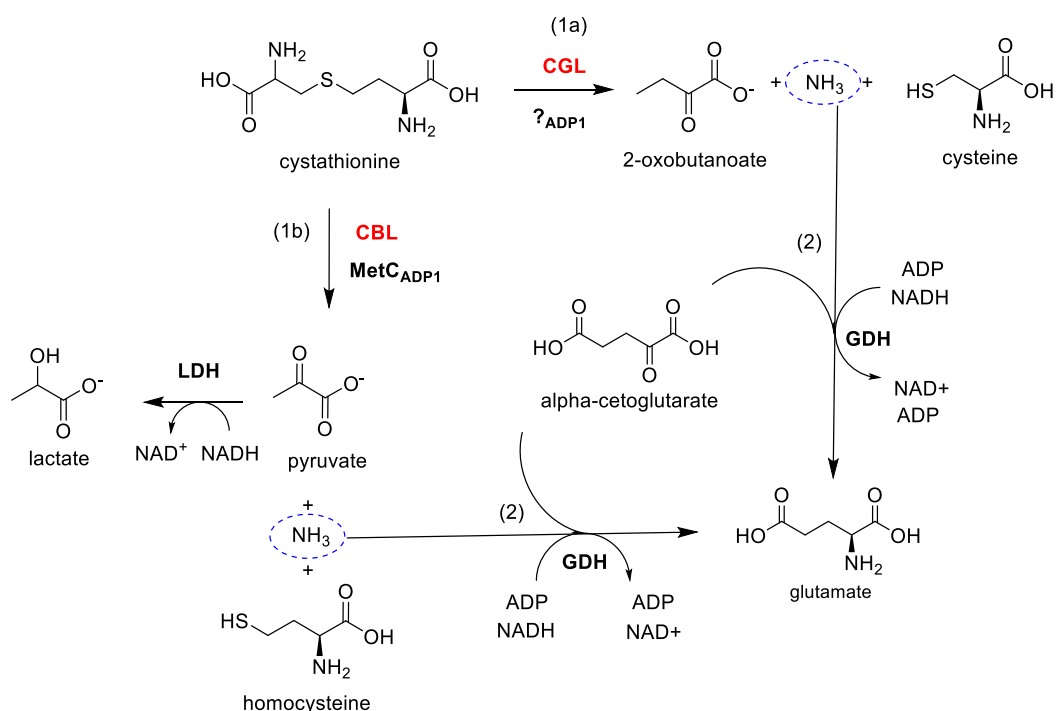


Figure 110 : Exploration des activités cystathionine γ -lyase (CGL) et cystathionine β -lyase (CBL) sur les enzymes à PLP d'ADP1. (1a) réaction effectuée sur une nuit pour accumuler éventuellement du NH_3 formé par une CGL puis (2) dosage du NH_3 formé grâce au test couplé à la GDH et au suivi à 340 nm de la conversion du NADH en NAD^+ . (1b) activité CBL qui pourrait fausser les résultats, enzyme qui sera écartée grâce au test couplé à la LDH qui dose le pyruvate éventuellement formé dans ce cas.

Les résultats des différentes campagnes de criblage menées en plaques 96 puits n'ont cependant pas permis d'identifier de CGL parmi les enzymes correctement purifiées, peut-être en raison d'un fort bruit de fond dans le signal obtenu. MetC, la CBL d'ADP1, était présente sur la plaque et a été utilisée comme témoin positif pour les deux tests couplés. Malgré le bruit du test, les deux tests couplés ont confirmé l'activité CBL de MetC, démontrant quand même que si une activité significative existait pour une autre enzyme elle aurait sans doute été détectée.

Il est de plus à noter que lors du criblage de la plaque d'enzymes à PLP via le test couplé à la LDH pour la détection d'une activité CBL, une autre enzyme que MetC s'est révélée active, mais seulement sur une des deux plaques testées (où sa concentration était la plus importante). Il s'agit de l'ACIAD2087, annotée comme glutamate-pyruvate transaminase AlaA. Le gène codant pour cette enzyme est conservé en synténie chez les *Pseudomonas* avec deux autres gènes codant pour des enzymes impliquées dans le système antioxydant via le glutathion (la glutathion peroxydase Gpo et la peptide méthionine sulfoxide réductase MsrB). L'isoenzyme candidate a donc été purifiée en tube et retestée afin d'en déterminer les paramètres cinétiques, mais aucune activité CBL n'a alors pu être détectée. Des investigations sont en cours au laboratoire : pensant que cette enzyme était une CBL, le double mutant $\Delta metC/ACIAD2087$ a été réalisé au laboratoire, conduisant à une auxotrophie au sulfate et corroborant les résultats préliminaires obtenus en plaque. Ce double mutant est en cours d'analyse : des données préliminaires sur L-méthionine, contradictoires avec une activité CBL uniquement, nécessitent d'approfondir le rôle de cette transaminase dans le métabolisme du soufre chez ADP1. L'activité CBL doit également être validée. Des études de complémentation d'un mutant $\Delta metC$ d'*E. coli* (collection KEIO) auxotrophe à la méthionine ont été entreprises au laboratoire mais des résultats non reproductibles ont été obtenus.

Afin de vérifier qu'une activité CGL plus faible n'ait pu être mesurée au spectrophotomètre avec notre test couplé, j'ai tenté de mettre au point avec l'aide d'Aurélié Fossey du LCOB une méthode de détection plus précise. Cette seconde approche reposait sur la détection de la formation de L-cystéine par HPLC (la LC-MS du LGBM n'ayant pas été disponible à cette époque), après dérivatisation par chlorure de benzoyle (BzCl) de l'acide aminé directement dans le milieu réactionnel (réaction sur 24h), afin de le rendre visible en UV à 200 nm. Des résultats préliminaires ont révélé trois candidats (avec des activités faibles), dont la L-2,4-diaminobutyrate décarboxylase ou carboxylase (ACIAD1211), qui a montré le plus fort taux de conversion de CTT en cystéine (5 %). Finalement les essais ne se sont pas avérés reproductibles.

Pour conclure, la recherche des enzymes de cette possible voie réverse n'a ainsi pas abouti à l'identification de l'enzyme responsable de la seconde étape, indispensable à la formation de L-cystéine. Une ultime vérification pourrait néanmoins être faite en injectant les milieux réactionnels sur le spectromètre de masse Orbitrap Elite™ afin de détecter directement la présence ou non de L-cystéine. Il est à noter, comme mentionné en début de section, qu'environ 1/3 des enzymes à PLP n'ont pas pu être purifiées convenablement et n'ont donc pas été testées. Cependant, à la lumière des résultats suivants, l'élucidation de cette voie a été abandonnée.

3.2.2 Recherche des enzymes impliquées dans la voie de recyclage par phénotypage de la collection de mutants

Puisque nous n'avons pas pu mettre en évidence d'enzymes impliquées dans le recyclage de la L-méthionine par notre approche ciblée précédente, nous avons décidé d'avoir recours au phénotypage total de la collection de mutants d'ADP1 en présence de L-méthionine. Cette démarche avait déjà été utilisée au laboratoire dans d'autres études et avait permis de révéler la voie de dégradation du glucarate/galactarate³⁷⁸ ou très récemment celle de la trigonelline³⁷⁶. Une campagne de phénotypage a été menée afin de révéler les enzymes mais aussi les transporteurs et les régulateurs nécessaires à l'assimilation de la méthionine. Chronologiquement, cette campagne de phénotypage a été entreprise après que j'ai testé plusieurs sources de soufre sur la souche sauvage d'ADP1. Cette campagne étant assez lourde, nous en avons profité pour tester plusieurs autres sources de soufre que nous aborderons au fur et à mesure. L'expérience a été planifiée et préparée avec Marielle Besnard-Gonnet, que j'ai secondée durant cette campagne, et qui est en charge de la gestion de la collection des 2400 mutants de délétion d'ADP1 (répartis sur 28 plaques 96 puits appelées plaques « Stock ») et de son phénotypage (figure 111).

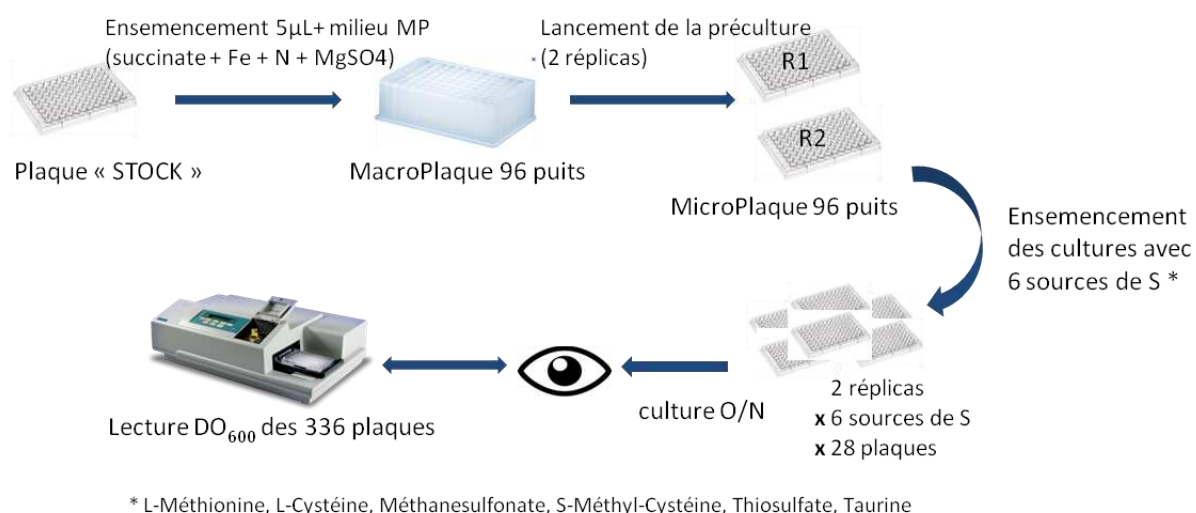


Figure 111 : Description de la campagne de phénotypage sur différentes sources de soufre réalisée sur la banque de mutants KO d'ADP1.

Tout d'abord, les mutants sont remis en culture sur le milieu défini sur lequel ils ont été obtenus (avec le sulfate comme source de soufre). Puis ces plaques mères sont utilisées pour préparer des précultures en duplicas biologiques. Ces précultures servent ensuite à ensemercer les cultures sur les différentes sources de soufre choisies, dont la méthionine : après 24h de croissance à 30°C, une unique mesure de la densité optique à 600 nm est réalisée pour chaque plaque, ainsi qu'une analyse visuelle permettant de déterminer les mutants dont la croissance a été affectée et de les comparer aux mesures spectrophotométriques obtenues. Les données de DO_{600} sont ensuite normalisées et traitées via un algorithme mis au point au Genoscope par Vanina Castelli : celui-ci permet de générer des cartes de croissance résumant l'état de croissance de l'ensemble des mutants au bout de 24h sur une source de soufre vis-à-vis d'une autre (cf. exemple figure 112). Cela permet ainsi de traiter 2 à 2 toutes les sources de S testées. Un contrôle est toujours fait avec la collection en présence de sulfate ou de L-Cystéine.

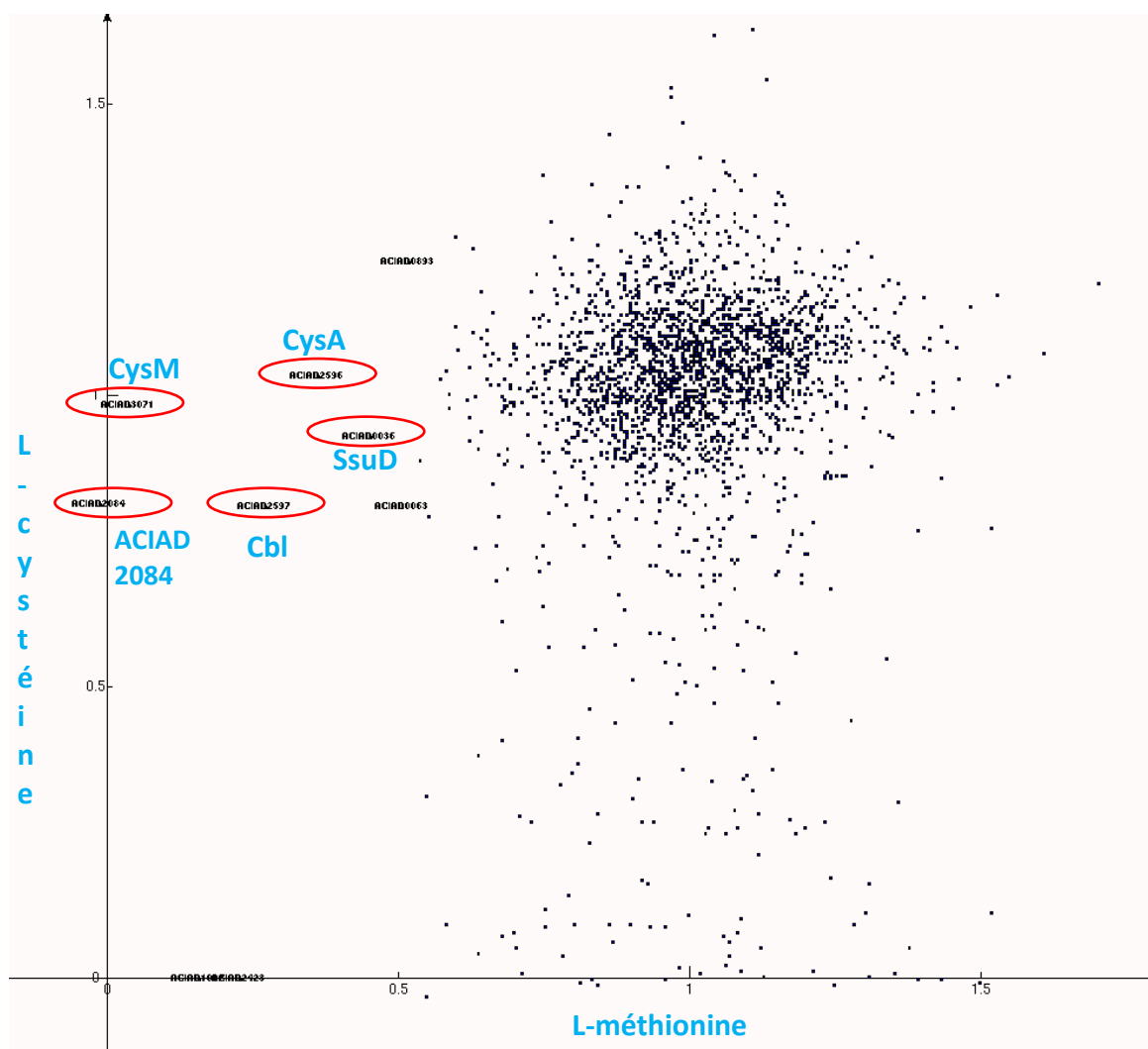


Figure 112 : Carte comparant la croissance des mutants KO d'ADP1 sur L-cystéine vs L-méthionine. Les points situés au centre de la figure représentent des mutants dont la croissance n'est pas affectée, quelle que soit la source de soufre, et qui ont une DO autour de 1 au bout de 24h. Les mutants proches de l'axe des abscisses sont ceux dont la croissance est affectée sur L-cystéine, tandis que ceux proches de l'axe des ordonnées ont une croissance affectée sur L-méthionine.

Le phénotypage de la collection de mutants n'a révélé que peu de gènes essentiels ou affectés, quelle que soit la source de soufre testée (L-méthionine, L-cystéine, méthanesulfonate, taurine, S-méthyl-L-cystéine). Dans la suite de l'analyse, nous allons nous focaliser sur les résultats concernant la L-méthionine. À noter toutefois que l'expérience en présence de L-cystéine a donné de nombreux mutants affectés dont les données n'étaient pas toujours reproductibles sur nos duplicas. Ces résultats devront faire l'objet d'une étude ultérieure plus approfondie que je n'ai pas eu le temps d'aborder. Cependant, les gènes essentiels sur L-cystéine sont sans lien direct évident avec le métabolisme du soufre, et sont difficilement interprétables. Ils n'apportent ainsi pas d'indices supplémentaires sur les voies d'assimilation du soufre, en particulier celui contenu dans la méthionine. Enfin, ils ne permettent pas non plus de mettre en évidence les mécanismes de régulation ayant lieu, si ce n'est le rôle important du régulateur Cbl.

Sur L-méthionine, seulement 2 gènes (ACIAD2084 et *cysM*) ont été trouvés comme réellement essentiels, et la délétion de 3 autres a affecté très fortement la croissance d'ADP1 (*cysA*, *ssuD* et *cbI*). Concernant tout d'abord les 2 gènes essentiels :

- L'ACIAD2084 a été annoté comme codant pour un putatif régulateur transcriptionnel de la famille AraC (AFTR). Les AFTRs constituent l'une des plus grandes familles de protéines régulatrices chez les bactéries, tout comme les familles LysR et TetR citées en introduction. L'analyse du contexte génomique particulier de l'ACIAD2084 (figure 113) nous a révélé qu'il fait partie d'un cluster de gènes jouxtant la transaminase AlaA (ACIAD2087) évoquée précédemment, à l'activité CBL suspectée. Le cluster de gènes est formé d'une glutathione peroxidase et du gène *msrB* codant pour une méthionine sulfoxide réductase. Les protéines Msr sont ubiquitaires dans le vivant et permettent aux cellules notamment de se protéger contre le stress oxydant, en catalysant la réduction des résidus méthionine oxydés (méthionine sulfoxyde)⁴²⁴. Ce régulateur ACIAD2084 semble donc être essentiel à l'assimilation de la L-méthionine ou alors à la régulation du système de défense contre le stress oxydatif éventuel qui pourrait résulter de la présence de la L-méthionine. Son rôle reste encore à élucider.

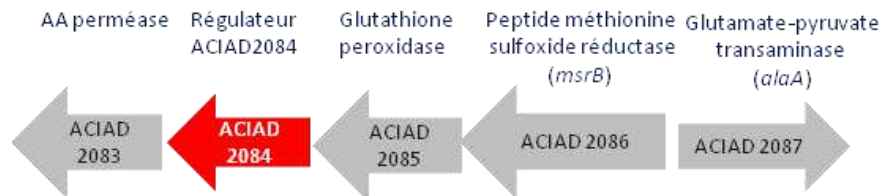


Figure 113 : Contexte génomique chez ADP1 du putatif régulateur transcriptionnel de la famille AraC (ACIAD2084), essentiel sur L-méthionine. Analyse réalisée via MicroScope/MaGe.

- Le gène *cysM* (ACIAD3071) semble également être essentiel quand la méthionine est source de soufre chez ADP1, suggérant une implication dans la voie de recyclage de la L-méthionine et par conséquent la probable production d'H₂S à partir de cette L-méthionine pour la synthèse de L-cystéine (figure 114). En référence à la description faite en introduction, ce résultat suggère aussi que cette voie de recyclage passe probablement via le méthanesulfonate et/ou le méthanethiol (comme chez *P. putida*) bien qu'aucun homologue à une MGL n'ait pu être trouvé chez ADP1 par homologie de séquence. Ce résultat est supporté par le fait que les tests de croissance de la souche sauvage réalisés en parallèle ont montré que le méthanesulfonate est également source de soufre chez ADP1. Ce qui est étonnant dans ce résultat de phénotypage, et qui sera confirmé par la suite, c'est que la deuxième CS (CysK) ne puisse compenser la mutation de CysM en présence de L-méthionine, alors que, dans le sens de biosynthèse de la L-cystéine, aucune des deux cystéines synthases CysK et CysM n'est essentielle en présence de sulfate. Ce résultat suggère sans doute un mécanisme de régulation des CS en présence de L-méthionine.

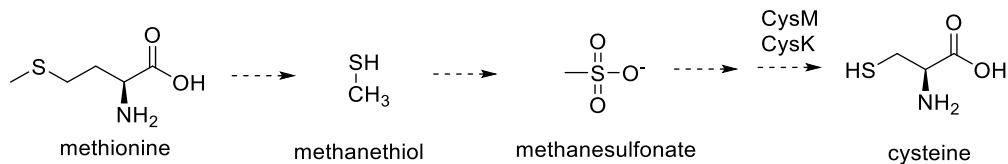


Figure 114 : Voie de recyclage de la méthionine vers la cystéine via le méthanethiol. Le recyclage de la L-méthionine vers la production d'H₂S passe probablement par l'intermédiaire méthanesulfonate, celui-ci étant également source de soufre chez ADP1.

Concernant les gènes dont la délétion affecte la croissance sur L-méthionine :

- La protéine CysA (encodé par l'ACIAD2596) fait partie du transporteur ABC CysAWTP, connu chez *E. coli* pour être impliqué dans l'import de sulfate, thiosulfate et sélénate. CysA forme la partie intracellulaire de ce complexe (figure 115A) et porte le site de fixation à l'ATP. Chez ADP1, comme chez *E. coli*, il existe un transporteur spécifique de la DL-méthionine, MetQNI (ACIAD2068 à 2070), MetN étant la protéine liant l'ATP et pour laquelle il existe deux autres homologues chez ADP1, les ACIADs 2450 et 3592 avec 45 % et 47 % d'identité avec MetN. Cela peut d'ailleurs expliquer pourquoi, d'après nos données de phénotypage, le mutant $\Delta metN$ n'est pas affecté sur L-méthionine. Néanmoins, la croissance fortement affectée du mutant $\Delta cysA$ semblent indiquer que le transporteur CysAWTP joue également un rôle important dans le transport de la L-méthionine chez ADP1. Enfin, chez *E. coli*, le régulon *cysPTWAM* est sous le contrôle de CysB, absent chez ADP1.

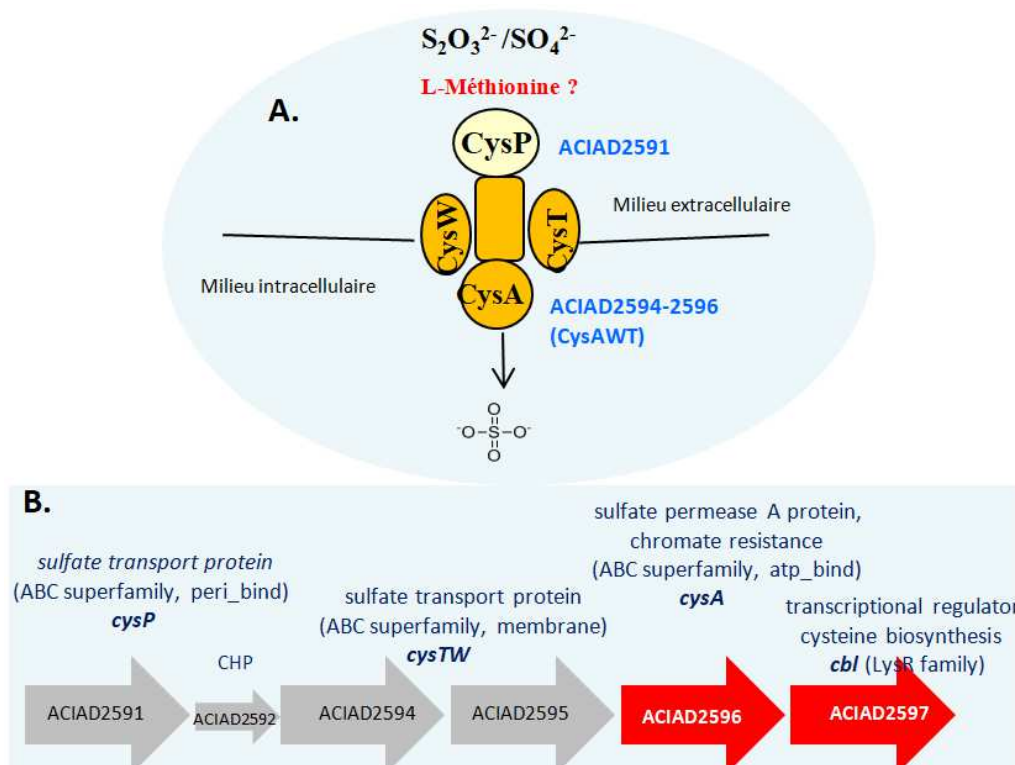


Figure 115 : Transporteur CysAWTP et contexte génomique. A. Composition et rôle du complexe CysAWTP. B. Contexte génomique du gène *cysA*.

- La croissance sur 24h du mutant ΔCbl a été très affectée sur L-méthionine, démontrant son implication dans le recyclage de cette dernière. Cbl (ACIAD2597 – famille LysR) est décrit comme le régulateur transcriptionnel des gènes impliqués dans l'assimilation des alcanes sulfonates. Pour rappel, chez *E. coli*, *cbl* joue le rôle d'activateur transcriptionnel des opérons *ssuEADCB/tauABCD*, et dans une moindre mesure de régulateur du régulon *cys* en l'absence de sulfates. Cependant, chez *E. coli*, Cbl est sous le contrôle de CysB, régulateur majeur du métabolisme du soufre (régulon *cys*), sans orthologue chez ADP1. C'est d'ailleurs également le cas chez *Burkholderia cenocepacia*, chez qui l'action de Cbl (appelée SsuR chez *B. cenocepacia*, Uniprot ID : B4E8S9) sur la transcription du cluster de gènes *ssu* a été démontrée²⁵. Les données de phénotypage sur taurine et méthanesulfonate montrent également l'essentialité de Cbl dans leur assimilation par ADP1, et son rôle, comme chez *E. coli*, dans le métabolisme des alcanes sulfonates et de la taurine. Il faut noter à ce stade qu'il n'y a pas de cluster homologue à *tauABC*_{coli} chez ADP1. À noter également que Cbl n'est pas essentiel en présence de L-cystéine, thiosulfate et S-méthyl-L-cystéine testés comme source de soufre. Cbl_{ADP1} joue sans doute un rôle via la régulation du cluster *ssu*. La présence de ce régulateur semble ainsi nécessaire pour l'assimilation de la L-méthionine, et ce probablement via le cluster de gènes *ssu* comme nous allons le voir. Le régulateur de transcription Cbl est co-localisé avec les composantes du transporteur de sulfate CysAWTP décrit précédemment (figure 115B)

- L'analyse détaillée des données de phénotypage sur l'opéron *ssuABCD*, codant notamment pour des protéines de transport d'alcanesulfonates (SsuABC), a permis de confirmer son implication dans le transport des sulfonates et celui du recyclage de la L-méthionine. En effet, la croissance du mutant $\Delta ssuD$ est très affectée en présence de L-méthionine (figure 112). SsuD est une méthanesulfonate monooxygénase. À noter que le cluster ne contient pas de réductase et qu'aucune réductase n'a été trouvée comme essentielle en présence de L-méthionine, signifiant sans doute qu'une autre réductase peut interagir avec SsuD. De même, le fait que la croissance du mutant $\Delta ssuD$ soit seulement affectée (et pas empêchée) sur méthionine montre qu'il y a au moins une autre méthanesulfonate monooxygénase dans le génome. En accord avec cette hypothèse, la croissance de $\Delta ssuD$ est très affectée en présence de méthanesulfonate (et de la taurine). Les données de phénotypage ont montré également par exemple que les protéines codées par les gènes *ssuBC* et *ssuA* sont impliquées dans le métabolisme du méthanesulfonate et de la taurine respectivement. En outre, le fait que chez le mutant $\Delta ssuD$ la croissance est seulement affectée sur méthionine et méthanesulfonate montre que d'autres iso-enzymes doivent exister chez ADP1, notamment pour la voie de recyclage de la méthionine. Néanmoins, ce résultat concorde avec la croissance altérée obtenue sur le mutant Δcbl , activateur contrôlant l'expression de la méthanesulfonate monooxygénase SsuD, ainsi qu'avec le fait que le méthanesulfonate constitue sûrement un intermédiaire de la voie de recyclage de la méthionine passant par le méthanethiol.

Le phénotypage de la banque de mutants a donc révélé contre toute attente que le recyclage de la L-méthionine était réalisé via le méthanesulfonate (importance de SsuD) et via la production de H₂S (essentialité de CysM) sous le contrôle du régulateur de transcription Cbl. La question qui s'est alors posée a été de savoir si cette voie de recyclage est la voie privilégiée chez ADP1 ou si une autre voie, telle que la transsulfuration réverse, existe malgré nos recherches. Afin d'éliminer définitivement

cette possibilité et pour prouver que ce recyclage passe bien uniquement par la production de H₂S, il a été décidé de découpler ces deux voies en empêchant la production de H₂S à partir de la réduction des sulfites par la réductase CysI (figure 116), encodée par le gène essentiel *cysI* sur sulfates. Comme attendu, ce mutant n'avait pas été acquis dans la banque de mutants obtenus sur sulfate⁷³, et je n'ai pas pu tester immédiatement cette hypothèse.

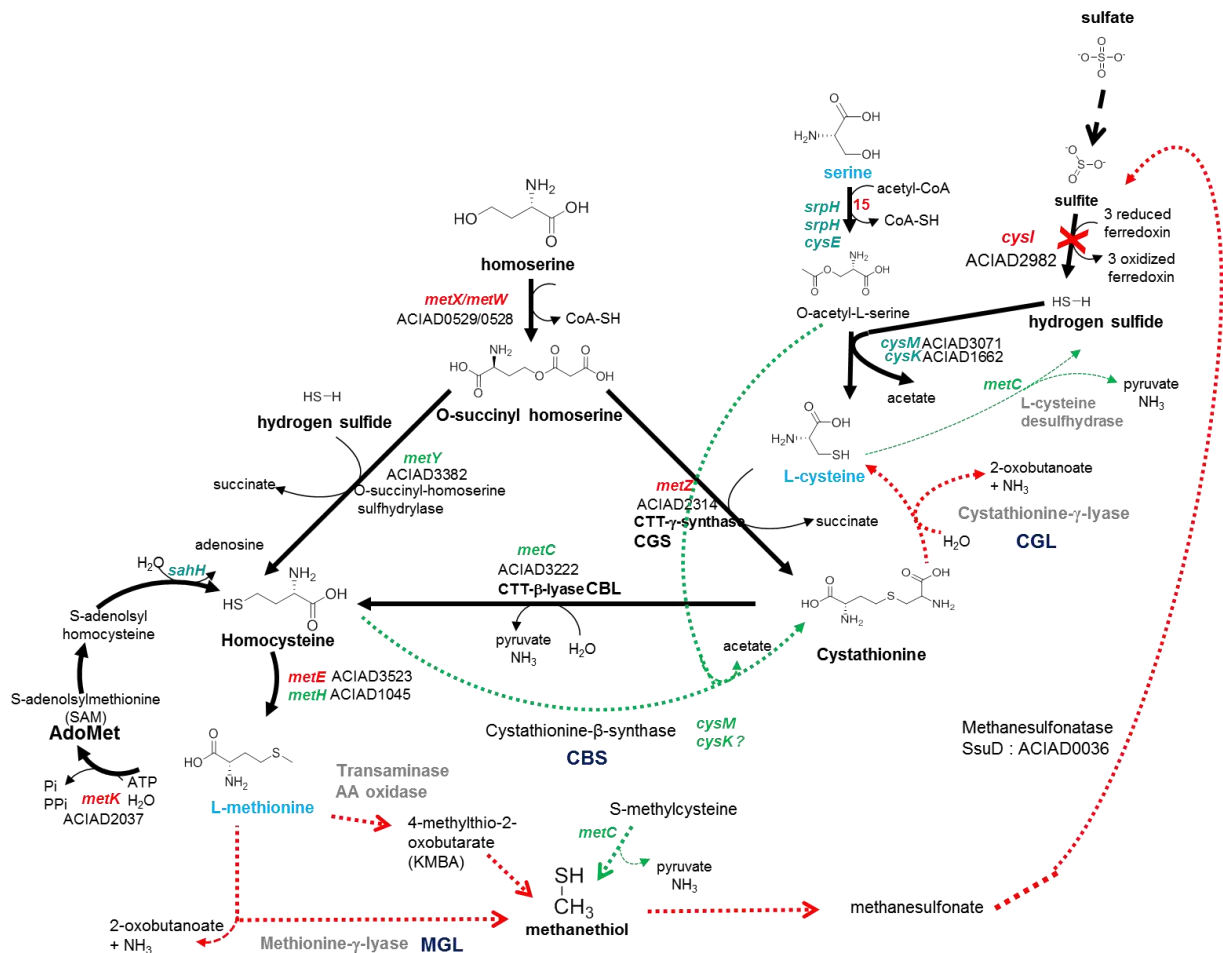


Figure 116 : Découplage des voies de transsulfuration réverse et de recyclage de la L-méthionine via la voie du méthane-thiol et de la production d'H₂S. En vert, les réactions mises en évidence *in vitro*, en rouge les voies possibles de recyclage de la L-méthionine. La croix rouge indique l'étape réactionnelle à supprimer *in vivo* afin de découpler les deux voies de recyclage.

3.2.3 Construction du mutant ΔCysI et vérification de l'hypothèse : la voie de recyclage de la L-méthionine passe par la production de H₂S

3.2.3.1 Construction du mutant $\Delta cysl$ ($\Delta ACIAD2982$)

Pour éliminer des hypothèses sur les voies de recyclage, j'ai entrepris d'obtenir le mutant $\Delta cysl$ du nom du gène codant pour la sulfite réductase (ACIAD2982) et essentiel sur sulfate, en utilisant la même méthode que celle utilisée pour l'obtention de la banque de mutants KO d'ADP1 au laboratoire⁷³, mais avec un milieu complété cette fois en L-cystéine en place du sulfate comme source de soufre. L'essentialité de $\Delta cysl$ sur méthionine comme source de « S » démontrerait ainsi l'existence seule de la voie de recyclage de la méthionine via le méthanesulfonate, tandis qu'une croissance suggérerait au contraire qu'une autre voie existe ou co-existe.

Brièvement, la méthode utilisée (figure 117) pour l'obtention de la banque tire profit du fait qu'ADP1 est naturellement compétente et réalise la recombinaison homologe. Les primers de PCR choisis à l'époque de l'obtention de la collection de mutants pour la délétion de *cysl* ainsi que ceux prévus pour sa validation ont été réutilisés ici. Premièrement, j'ai construit par PCR successives une cassette de délétion portant un gène de résistance à un antibiotique (kanamycine), cassette Kan^R, flanquée de deux pieds de recombinaison (R1 et R2) correspondant à des régions d'environ 300 pb en amont et en aval du gène à éliminer, ici *cysl*. Cette cassette a ensuite été mise dans une culture d'ADP1 en début de phase exponentielle de croissance, phase dans laquelle ADP1 acquiert son maximum de compétence naturelle à la transformation. Le produit de PCR est ainsi directement intégré à la cellule, et ADP1 réalise ensuite la recombinaison homologe. Des PCR de vérification en utilisant des primers internes (S1 et S2) et externes (P7 et P8) à la cassette d'intégration ont ensuite été menées afin de vérifier que le gène a bien été délété et remplacé par un fragment d'environ 2300 pb, soit 1720 pb de la cassette Kan^R et ~600 pb des régions flanquantes.

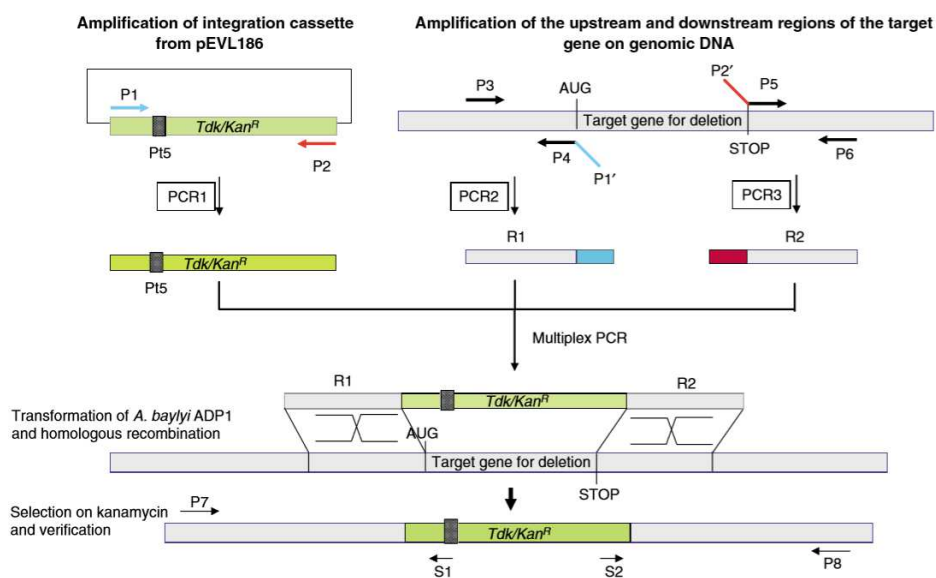


Figure 117 : Méthode de délétion de *cysl* par intégration d'une cassette portant un gène de résistance à la kanamycine. Les primers P1 à P6 permettent de construire la cassette d'intégration. Les primers P7, P8, S1 and S2 pour les vérifications. Les régions flanquantes de la cassette pour la recombinaison homologe sont construites par amplifications de la région en amont à *cysl* par les primers P3/P4 (région P1) et la région en aval par les primers P5/P6 (région R2) (issu de Berardinis et al., 2008).

3.2.3.2 Phénotypage du mutant $\Delta cysI$

Une fois le mutant $\Delta cysI$ obtenu, celui-ci a été mis en culture afin d'effectuer une nouvelle étude phénotypique. Toutes les études de croissance sur les différentes sources de soufre ayant été faites à partir de ce point par des cinétiques de croissance acquises grâce à l'appareil Bioscreen, nous avons testé ce mutant $\Delta cysI$ dans les mêmes conditions que nous allons décrire maintenant et qui resteront valables pour la suite (figure 118).

Brièvement, une préculture a été réalisée sur la nuit à 30°C et sur milieu défini avec la source de soufre à tester (L-méthionine pour $\Delta cysI$) ou sulfate. Celle-ci a été ensuite lavée 3 fois sur milieu minimum sans soufre pour éliminer toute trace de soufre, puis des plaques de Bioscreen contenant ce même milieu ont étéensemencées au 1/100^{ème} avec la préculture. À noter que la problématique de la contamination en source de soufre par les composants du milieu a fait l'objet d'une recherche des produits les moins contaminés dans le commerce. Dans le cas des mutants, aucun antibiotique n'a été utilisé du fait de la contamination de la kanamycine commerciale par une source de soufre induisant une croissance notoire dans le témoin négatif. Pour chaque expérience, nous avons pris soin de rajouter un témoin négatif de croissance ainsi qu'un témoin positif (poussant sur sulfate ou cystéine suivant les cas). Chaque source de soufre a été testée en quadruplicatas (réplicas techniques), le suivi de la croissance thermostatée à 30°C se faisant à 600 nm via le Bioscreen. Les courbes de croissances obtenues ont ensuite été moyennées avant d'être analysées. Les expériences ont été reproduites une seconde fois (réplica biologique).

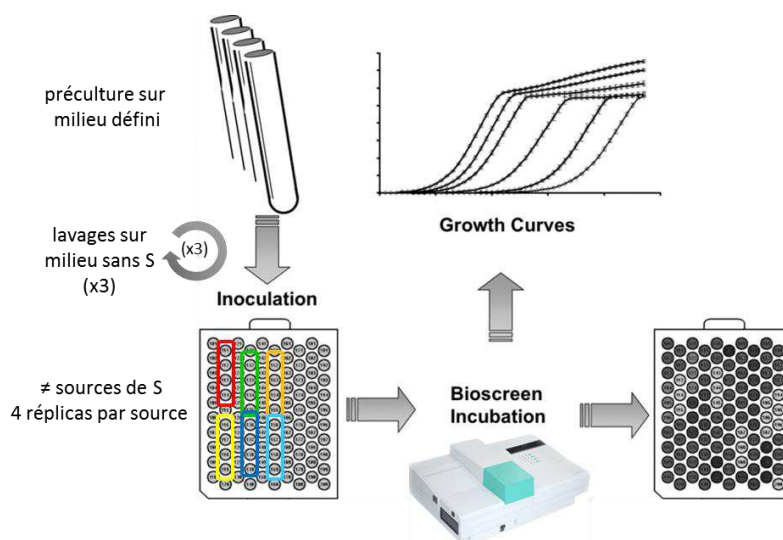


Figure 118 : Principe du phénotypage en Bioscreen

Comme attendu, le témoin négatif de notre expérience montre que le gène *cysI* est essentiel sur sulfate (figure 119), le mutant ne pouvant plus effectuer la réduction des sulfites en H_2S nécessaire pour la biosynthèse de L-cystéine. Les résultats ont montré surtout une absence de croissance en présence de L-méthionine, démontrant que la voie de recyclage de la L-méthionine passe uniquement via l' H_2S et qu'il n'y a pas de voie de transsulfuration réverse chez ADP1 (ou alors non active dans nos conditions). Cependant, l'essentialité sur L-méthionine n'est vérifiée que sur 15h de cinétique avec,

par la suite, une reprise de la croissance. Une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène serait l'effet de « pseudoréversion ». Cet effet a été notamment illustré lors de l'étude de la régulation de la réponse de *P. aeruginosa* exposé à une carence en sulfate par Hummerjohann et al. (1998)⁴²⁵. Les auteurs ont ainsi eu des difficultés à isoler des mutants de gènes *cys* (tout comme avant eux Calhoun & Feary en 1969), dont *cysI*, du fait de l'apparition rapide de « pseudorévérants », c.-à-d. de l'apparition dans un court laps de temps (8 à 24h) de mutants ayant supprimé leur auxotrophie sans avoir pour autant réparé les gènes mutés (absence de suppression des transposons insérés dans les gènes mutés dans le cadre de leur étude). Cet effet serait dû, lors de la croissance des bactéries durant cette phase de latence, à la sélection rapide de souches supprimant les effets de la mutation obtenue, suggérant l'apparition de mutations compensatrices. Il serait donc intéressant de rechercher les gènes modifiés en comparant les génomes d'un mutant $\Delta cysI$ en croissance sur L-cystéine et celui du mutant ayant finalement crû après 15h sur L-méthionine.

Une autre validation de l'absence d'une voie réverse a été réalisée en faisant pousser ce mutant en présence de CTT. Seule une très faible croissance a été constatée, légèrement au dessus du témoin négatif (figure 119). Cette légère croissance observée pourrait être due à une faible activité L-homocystéine désulfhydrase présente dans la cellule (relargant du H₂S), la L-CTT étant convertie en L-homocystéine par MetC, mais trop faible pour assurer sa viabilité. Cette expérience tend à montrer également qu'aucune CGL ne nous a échappé lors de notre criblage d'enzymes à PLP (ou bien même qu'il n'y pas de CGL qui ne serait pas une enzyme à PLP, ce qui était peu probable). Ces résultats constituent un argument supplémentaire quant à l'absence de voie de transsulfuration réverse complète chez ADP1.

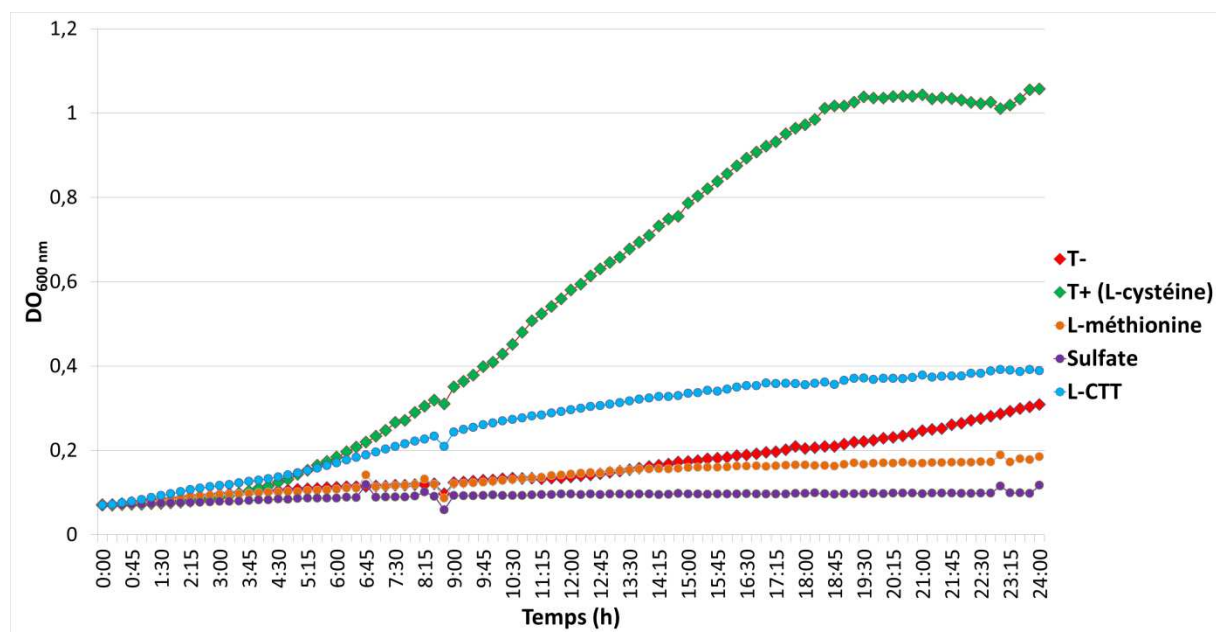


Figure 119 : Cinétiques de croissance du mutant $\Delta cysI$ sur différentes sources de S

Enfin, la croissance quasi-normale sur S-méthylcystéine de $\Delta cysI$ (figure 120) semble indiquer que son assimilation ne passe pas par la production de sulfite mais par une autre voie. Récemment, une voie métabolique permettant la conversion de la S-méthylcystéine en cystéine, sans oxydation du soufre (figure 121) a été décrite par Chan et al. chez *B. subtilis*⁴²⁶. Il s'agit de la voie de la N-

formylcystéine, débutant par une *N*-acétylation de la *S*-méthylcystéine par SnaA(SnaB), suivie d'une oxydation du groupement méthyl par CmoIJ et CmoO, puis d'une déacétylation et d'une *N*-formylation via SndABC, générant la *N*-formylcystéine qui sera finalement déformylée par DefB en cystéine.

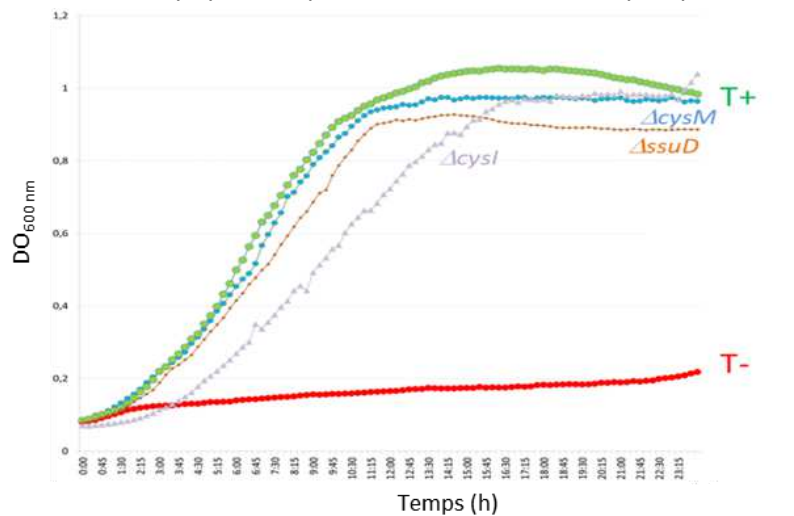


Figure 120 : Cinétiques de croissance des mutants $\Delta cysI$, $\Delta ssuD$ et $\Delta cysM$ en présence de *S*-méthylcystéine.

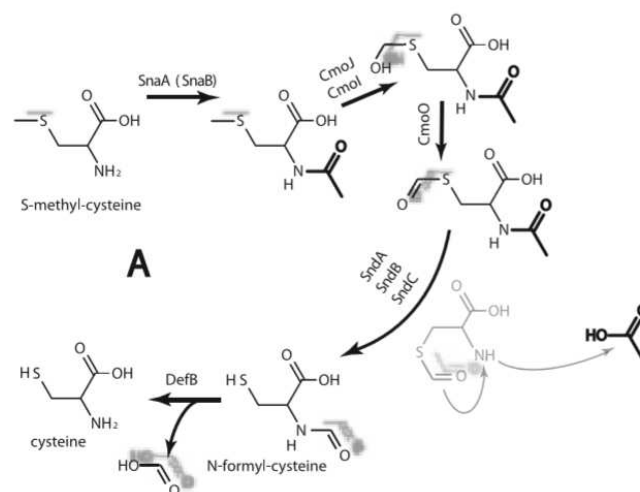


Figure 121 : Voie d'assimilation de la *S*-méthyl-cystéine proposée chez *Bacillus subtilis* (issu de Chan et al., 2013). Les auteurs ont ombré les liaisons soufrées oxydées dans cette voie.

Les gènes de cette voie sont regroupés chez *B. subtilis* en un opéron complexe *snaAtcyJKLMNcmoO_cmoIJ_rbfK_sndAytNM* qui inclut également des systèmes d'import de cystéine, cystathionine ou sulfoxides⁴²⁶. Une analyse via MicroScope de cette région nous a révélé que ce cluster est absent chez ADP1. On peut noter cependant que certains genes comme CmoI ont une homologie au mieux de 42 % avec des monooxygénases d'ADP1 (42 % avec NtaA (ACIAD1595)). Le phénotypage total de la collection de mutants sur *S*-méthylcystéine n'a cependant pas permis d'identifier de gènes essentiels parmi ces homologues. A contrario, il a montré que *ssuD* et *cysM* (figure 120 ci-dessus), ainsi que le régulateur *cbI* ne sont pas essentiels à son assimilation, démontrant que sa dégradation ne passe pas par cette voie et donc vraisemblablement pas par le méthaneéthiol/méthanesulfonate. Plus

globalement, ce phénotypage à 24h n'a pas montré de gène essentiel à l'assimilation de la S-méthylcystéine, montrant que cette assimilation est prise en charge par plusieurs isoenzymes.

En résumé, les tests de croissance du mutant $\Delta CysI$ semblent donc confirmer que le recyclage de la méthionine en cystéine passe bien par la production de méthanesulfonate et la production de H_2S . Cependant, à ce stade, nous ne savons ni comment le méthanesulfonate était produit, si ce n'est qu'il était probablement issu du méthanethiol, ni comment le méthanethiol était produit à partir de la L-méthionine.

3.2.4 Recyclage de la méthionine via le méthanesulfonate chez ADP1

Nous venons de montrer que le recyclage de la méthionine se faisait via la production de sulfites et que les résultats préliminaires montraient que le cluster *ssu* d'oxydation du méthanesulfonate semble impliqué. La seule voie de recyclage de la L-méthionine qui passe par la synthèse de méthanesulfonate à notre connaissance est celle qui passe par la synthèse de méthanethiol (cf. introduction). Un premier test de croissance sur la souche sauvage d'ADP1 a montré que le méthanethiol est une excellente source de soufre. Afin de continuer notre investigation, je me suis donc intéressé aux mutants auxotrophes à la méthionine révélés lors de la campagne du phénotypage total de la banque, et à leur comportement sur ces molécules soufrées. J'ai ensuite cherché à déterminer comment le méthanethiol est produit à partir de la L-méthionine chez ADP1. La recherche, plus complexe, des enzymes permettant de passer du méthanethiol au méthanesulfonate chez ADP1 sera traitée dans un second temps.

3.2.4.1 Phénotypage des mutants $\Delta cysM$, $\Delta cysI$, $\Delta ssuD$

De nouvelles cinétiques de croissance ont été lancées via le Bioscreen sur les trois mutants $\Delta cysM$, $\Delta ssuD$ et $\Delta cysI$. Les sulfates ont été utilisés comme témoin positif de croissance, sauf pour $\Delta cysI$ auxotrophe à la cystéine. Pour chaque mutant, la L-méthionine, le méthanesulfonate et le méthanethiol ont été utilisés comme source de S (figure 122). Pour $\Delta cysI$, il était important de pouvoir comparer la croissance sur méthanesulfonate et méthanethiol, car une croissance quasi-normale sur méthanethiol aurait signifié qu'il n'était pas recyclé en sulfite via le méthanesulfonate, mais directement en H_2S sous l'action d'une hypothétique méthanethiol oxydase. Or la croissance de $\Delta cysI$ s'est révélée négative pour ces deux substrats, tout comme sur méthionine. Ce même comportement, observé sur L-méthionine et les deux intermédiaires potentiels de la voie de recyclage, appuie l'hypothèse selon laquelle le recyclage passe par le méthanethiol et le méthanesulfonate.

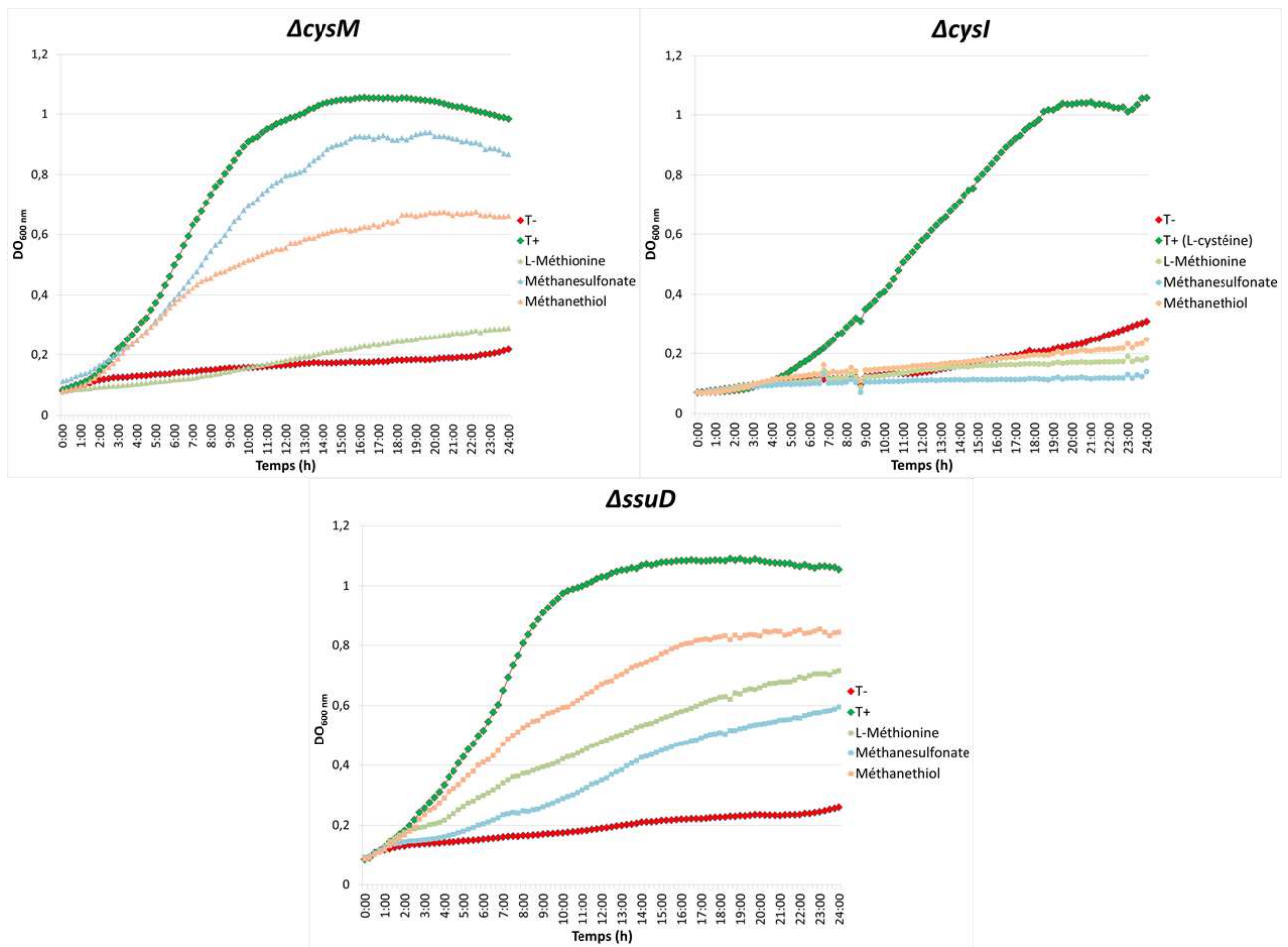


Figure 122 : Cinétiques de croissance des mutants $\Delta cysM$, $\Delta cysI$ et $\Delta ssuD$ sur L-méthionine, méthanethiol et méthanesulfonate.

Pour le mutant $\Delta cysM$, dont la croissance fortement affectée sur L-méthionine a été confirmée par ce phénotypage en Bioscreen, on peut voir que la croissance n'est que légèrement affectée sur méthanesulfonate tandis que le ralentissement est plus marqué sur méthanethiol. Cela pourrait montrer que CysK est moins exprimée que son isoforme CysM lorsqu'ADP1 croît sur méthanethiol versus méthanesulfonate (son activité est du moins négativement régulée d'une façon ou d'une autre), montrant encore une fois qu'une étude plus approfondie du rôle et surtout de l'expression de ces deux cystéine synthases dans différentes conditions de sources de soufre devraient être entreprises.

Enfin, la croissance du mutant $\Delta ssuD$ montre que celle-ci est affectée sur ces deux substrats, comme en présence de L-méthionine, avec des intensités différentes. Ainsi, d'autres alcanesulfonatasés jouent probablement également un rôle dans le recyclage de la méthionine. Cela permet néanmoins de consolider l'hypothèse selon laquelle le méthanesulfonate, ainsi que le méthaneéthiol, sont de probables intermédiaires de cette voie selon le schéma suivant (figure 123).

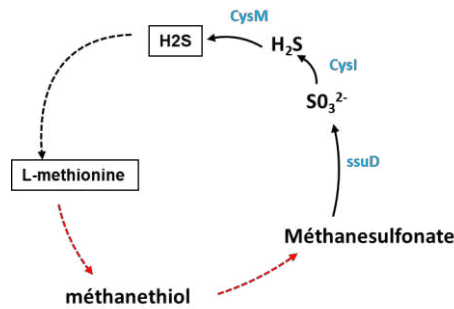


Figure 123 : Schéma résumant l'hypothèse d'une possible voie de recyclage de la L-méthionine chez ADP1. Les enzymes identifiées sont marquées en bleu. Les étapes inconnues chez ADP1 sont en pointillés rouges.

3.2.4.2 Conversion de la L-méthionine en méthanethiol

Le méthanethiol étant sans doute un intermédiaire de la voie de recyclage de la méthionine, nous nous sommes penchés sur la formation de cette molécule. Trois voies permettant de synthétiser du méthanethiol à partir de la méthionine ont été décrites chez les bactéries, comme nous l'avons vu en introduction : l'une nécessite une méthionine γ -lyase (MGL) et se déroule en seulement une étape, tandis que les deux autres nécessitent la formation de KMBA, soit via le cycle de Yang (cycle du MTA), soit directement à partir de la méthionine via l'intervention d'une méthionine transaminase (Met-TAM), puis sa conversion en méthanethiol. Par ailleurs, aucune enzyme n'a encore été identifiée comme catalysant cette dernière étape, qui pourrait se faire non enzymatiquement. Il a donc été entrepris de rechercher ces enzymes impliquées dans la conversion de la méthionine en méthanethiol chez ADP1.

- Recherche d'une méthionine γ -lyase chez ADP1

Aucune MGL n'a été annotée dans le génome d'ADP1 et les plus proches homologues trouvés de MdeA, l'enzyme à PLP dont l'activité MGL a été décrite chez *P. putida*, se sont révélés être MetZ et MetY avec pour tous deux 40 % d'identité. J'ai donc utilisé la plaque d'enzymes à PLP purifiées issues d'ADP1 afin de cribler l'activité MGL via le test spectrophotométrique couplé à la GDH. En effet la réaction de γ -élimination sur la méthionine entraîne la production de NH_3 qui, comme nous l'avons vu, peut être mis en évidence via la GDH et la consommation de NADH à 340 nm (figure 124).

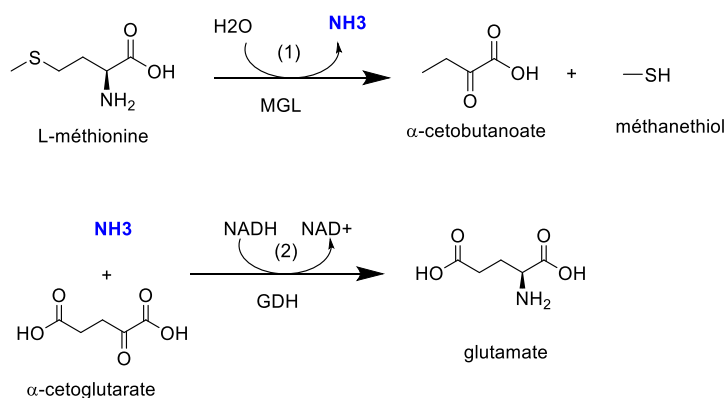


Figure 124 : Détection de l'activité méthionine γ-lyase à 340 nm via le test couplé à la GDH

Cependant, dans nos conditions, aucune activité MGL n'a pu être mesurée. En l'absence de témoin positif pour ce test, et bien qu'on ne puisse pas exclure le cas peu probable qu'une enzyme qui ne serait pas à PLP soit une MGL, nous nous sommes alors tournés vers la recherche d'une Met-TAM.

- Recherche des enzymes de la voie via le KMBA

La première chose à vérifier a été de faire croître ADP1 sur KMBA, qui s'est en effet révélé être une excellente source de soufre pour ADP1, au même titre que la méthionine. Des cinétiques de croissance sur les mutants *ΔcysI* et *ΔssuD* ont également été réalisées afin de vérifier d'une part que le KMBA constitue un intermédiaire possible de la voie de recyclage de la méthionine passant par la production de sulfites et non une autre voie (menant à la production d'H₂S), et d'autre part d'observer si l'utilisation du KMBA par la cellule mobilise des alcanesulfonatasés comme c'est le cas pour le méthanesulfonate. Les résultats ont été superposés aux croissances déjà mesurées sur ces mutants (cf. partie 3.2.4.1) et sont visibles dans la figure 125. Premièrement, le KMBA n'est plus une source de S pour *ΔcysI* et *ΔcysM*, comme la méthionine, vérifiant la 1^{ère} hypothèse. Pour le mutant *ΔssuD*, la croissance sur KMBA s'est avérée similaire à celles observées sur L-méthionine et L-méthanesulfonate, et donc un peu plus faible que celle observée sur méthaneéthiol. L'utilisation du S du KMBA impliquerait donc une voie similaire à celle de la méthionine et du méthanesulfonate, sans que l'on puisse dire à ce niveau si le KMBA est issu ou donne de la méthionine (cycle du MTA), et donc si le méthaneéthiol provient du KMBA ou de la méthionine.

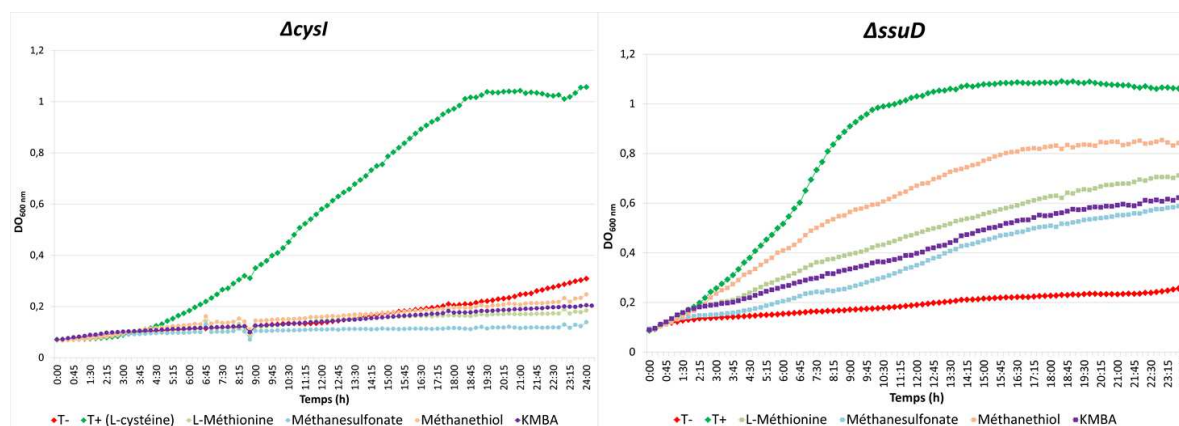


Figure 125 : Cinétiques de croissance des mutants *ΔcysI* et *ΔssuD* sur KMBA

Nous avons donc recherché, comme cela est décrit dans la littérature, une méthionine transaminase capable de former du KMBA à partir de la méthionine, ou vice versa (cycle du MTA). Les Met-TAM de référence dans la littérature permettant la formation de KMBA à partir de L-méthionine sont YbdI_{coli}, celle-ci possédant 49 % d'identité avec l'ACIAD3553, annoté comme putative Met-TAM, et TyrB_{pneumoniae}, ayant 62 % d'identité avec TyrB_{ADP1}, la tyrosine aminotransferase d'ADP1. Il s'agit pour toutes les deux d'enzymes PLP-dépendantes. Il a donc été entrepris de réaliser un criblage de l'activité Met-TAM à nouveau avec la plaque d'enzymes à PLP d'ADP1. Pour cela, le test couplé à la GDH a été adapté (figure 126) : (1) les potentielles TAM à PLP sont d'abord mises en présence de méthionine et d' α -cétoglutarate, et, si la réaction a lieu, du KMBA et du glutamate devraient se former ; (2) le glutamate est consommé dans une seconde réaction en présence de la GDH et un signal croissant de l'absorbance à 340 nm, dû à la formation de NADH à partir du NAD⁺ également consommé par l'enzyme, devrait être mesuré. Le produit de cette réaction permet la régénération de l' α -cétoglutarate.

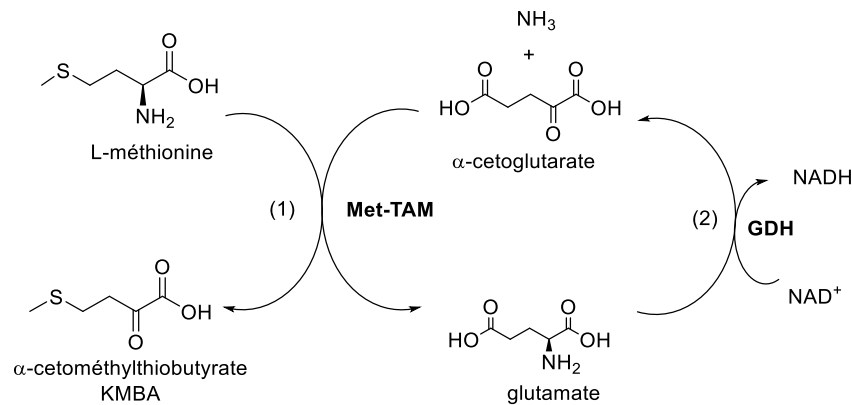


Figure 126 : Détection de l'activité méthionine transaminase à 340nm via le test couplé à la GDH

Un seul hit positif a été obtenu, l'activité mesurée ayant été détectée pour le puits contenant l'enzyme TyrB_{ADP1} (figure 127). À noter que l'ACIAD3553 faisait partie des enzymes non obtenues purifiées sur la plaque et donc que nous n'avons pas pu tester son activité lors de ce test. À noter également que ni les mutants Δ tyrB ni Δ ACIAD3553 n'ont été identifiés comme essentiels lors du phénotypage global de la collection en présence de méthionine. TyrB a quant à elle alors été purifiée au laboratoire en quantité plus importante afin de comparer les activités spécifiques TAM sur [L-méthionine et α -cétoglutarate] d'une part, et sur [KMBA et glutamate] d'autre part.

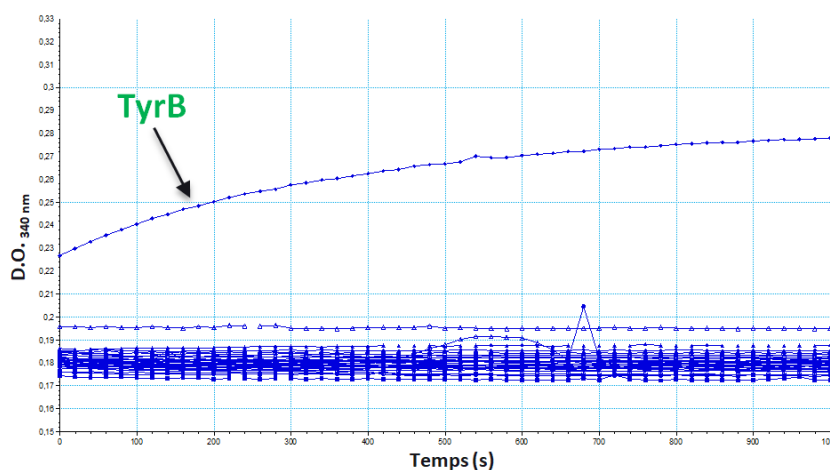


Figure 127 : Résultats du criblage de la plaque d'enzymes à PLP d'ADP1 sur l'activité Met-TAM.

Les résultats préliminaires semblent indiquer que l'activité TAM mesurée lorsque le donneur d'amine est le glutamate ($3,6 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \pm 0,1$) est $3 \cdot 10^2$ plus importante que lorsque le donneur d'amine est la méthionine, suggérant une préférence pour le sens KMBA vers méthionine du cycle du MTA. Cela serait en accord avec le fait que, chez les organismes aérobies, le coût du soufre réduit est tel que tout est fait pour éviter les transaminations déaminantes et la dégradation de la méthionine⁴²⁷. Par exemple chez *B. subtilis*, MtnE utilise la glutamine comme donneur d'amine et le KMBA comme accepteur, formant ainsi de la méthionine et de l' α -cétoglutarate²³⁰ (figure 128). Ce dernier a tendance à se cycliser pour former la 5-hydroxy-4-oxoproline dont le rôle est inconnu et qui serait probablement toxique pour la cellule. Pour éviter cela, une ω -amidase (MtnU, Uniprot ID : O31664) hydrolyse la fonction amide et produit de l' α -cétoglutarate qui peut alors être utilisé dans le cycle de Krebs. Aucune de ces deux enzymes n'a d'homologue significatif chez ADP1. Il serait ainsi intéressant de vérifier si TyrB fonctionne de la même manière avec la glutamine ou l'asparagine comme donneur de soufre mais nous n'avons pas pu dans le cadre de ma thèse réaliser ce travail d'approfondissement. Il pourrait être recherché ensuite chez ADP1 s'il existe une ω -amidase capable de catalyser l'hydrolyse de l' α -cétoglutarate formé, rendant la réaction irréversible. Un candidat bien que peu probable vu le pourcentage d'identité avec MtnU pourrait être l'ACIAD3340 (~30 % avec MtnU). Cela signifierait alors que la formation de méthaneéthiol chez ADP1 ne passe pas par cette transaminase. Enfin, on pourrait également envisager d'effectuer le même criblage en utilisant l' α -cétoglutarate ou le 2-oxosuccinate, composés non commerciaux, comme donneurs de soufre.

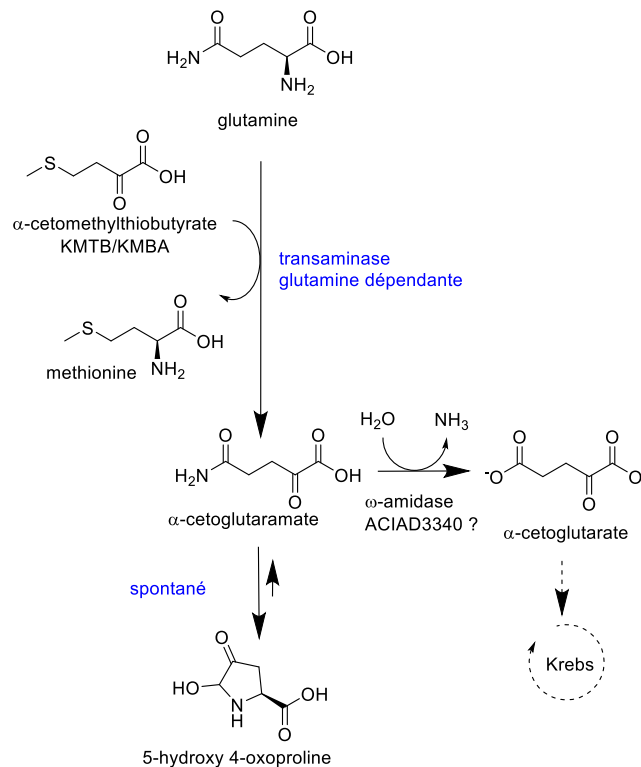


Figure 128 : Formation de la méthionine à partir du KMBA telle que suspectée chez ADP1

- Synthèse de KMBA via le cycle du MTA chez ADP1

Ainsi, les résultats préliminaires semblent montrer que le KMBA utilisé pour la synthèse de méthanoéthiol chez ADP1 ne serait pas issu directement de la méthionine via une Met-TAM, mais qu'il serait plutôt issu du cycle du MTA. Or, le cycle du MTA existe-t-il vraiment chez ADP1 et le KMBA en est-il un intermédiaire ? C'est à ces questions que nous allons maintenant tenter de répondre.

La présence de la voie de recyclage de la méthionine via le cycle du MTA, qui s'ancre sur celui de la S-adénosylméthionine (SAM ou AdoMet), a été suspectée pour diverses raisons : (1) le MTA permet une croissance significative bien que lente de la bactérie (figure 129). Cette lente croissance pourrait être due au fait que le MTA est peu soluble et qu'aucun transporteur du MTA n'ait encore été identifié chez ADP1. (2) Ce métabolite a par ailleurs été retrouvé dans le lysat d'ADP1 lors d'une étude métabolomique de la bactérie réalisée par Stuni et al. en 2014³⁷⁷. Pour consolider l'hypothèse de l'existence de cette voie chez ADP1, un autre intermédiaire potentiel de ce cycle, le méthylthioribose (MTR), plus soluble que le MTA et potentiellement plus facile à faire rentrer dans la cellule car moins volumineux, a été testé comme source de soufre. Le MTR, métabolite formé à partir du MTA n'étant pas commercial, je l'ai synthétisé en effectuant l'hydrolyse acide du MTA.

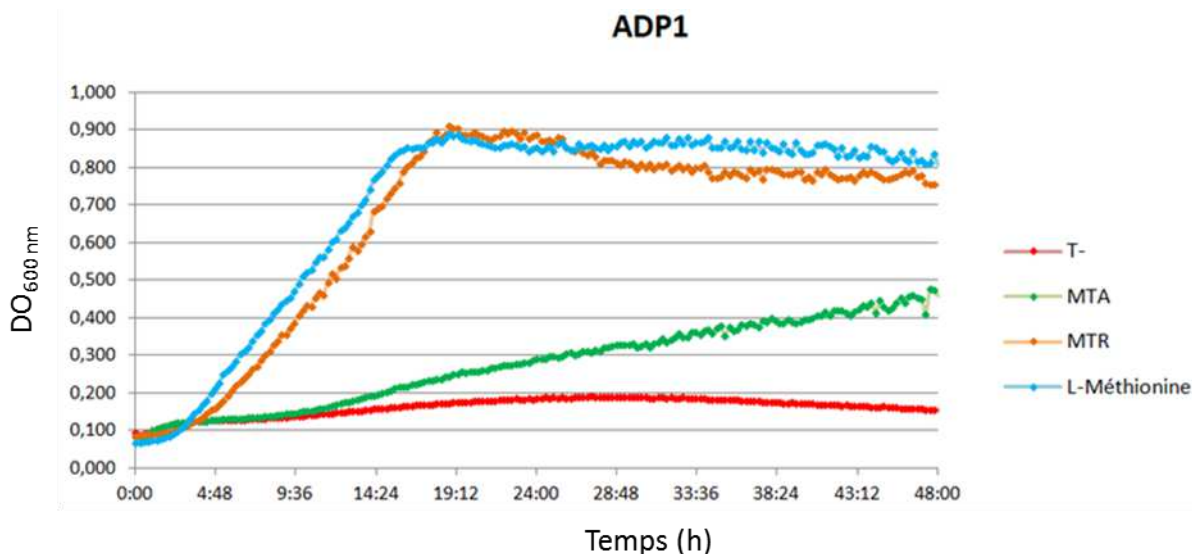


Figure 129 : Cinétiques de croissance du phénotype sauvage d'ADP1 sur MTA, MTR et méthionine

Le MTR s'est révélé être une excellente source de soufre (figure 129 ci-dessus), ce qui renforce l'existence de ce cycle chez ADP1 bien que presque aucun des gènes du cluster *mtn* décrit chez *Bacillus subtilis* n'ait été retrouvé chez ADP1, faisant du MTA un métabolite orphelin. Bien que non mis en évidence dans le métabolome d'ADP1, le MTR ne serait quant à lui pas orphelin selon l'annotation de la plateforme MicroScope/MaGe car il existe un gène *mtnN* (ACIAD3146) chez ADP1 annoté comme codant pour une méthylthioadénosine (MTA) / S-adenosylhomocystéine nucléosidase. Ce gène n'est conservé que chez de rares autres espèces d'*Acinetobacter* (analyse MicroScope) et l'enzyme correspondante ne présente aucune identité de séquence avec MtnN_{subtilis}. Plusieurs programmes de prédiction prédisent en effet une nucléoside phosphorylase mais aucun élément ne permet d'affirmer qu'il s'agit bien d'une MTA/SAM nucléosidase (si ce n'est qu'il partage 53 % d'identité avec Pfs_{coli}, enzyme bi-fonctionnelle catalysant cette réaction), laissant un doute quant à cette assignation de fonction. En revanche, le « meilleur homologue » chez ADP1 de MtnN_{subtilis} est l'ACIAD0773, bien que faible (~30 % d'identité avec MtnN_{subtilis}). Ce gène est prédit par différents programmes de prédiction de fonction comme étant une MTA / S-adenosylhomocystéine nucléosidase également, mais avec une plus grande confiance que pour ACIAD3146 : cela suggère que ce gène, très largement répandu chez les espèces d'*Acinetobacter*, serait un meilleur candidat. La fonction de ces deux gènes devra être vérifiée expérimentalement pour pouvoir les assigner avec certitude. En conclusion, aucun de ces deux gènes ne s'est révélé essentiel lors du phénotypage de la collection de mutants avec la L-méthionine comme source de soufre.

Il manque ainsi chez ADP1 les gènes en amont du cycle du MTA, permettant donc la synthèse du MTA à partir de la SAM, et ceux en aval du MTR, jusqu'à la formation du KMBA. TyrB serait alors un excellent candidat pour cloturer ce cycle. On ne peut cependant pas, avec l'ensemble de ces éléments, conclure avec certitude quant à une voie privilégiée chez ADP1 pour la formation de méthanthiol parmi les trois voies exposées et résumées dans la figure 130.

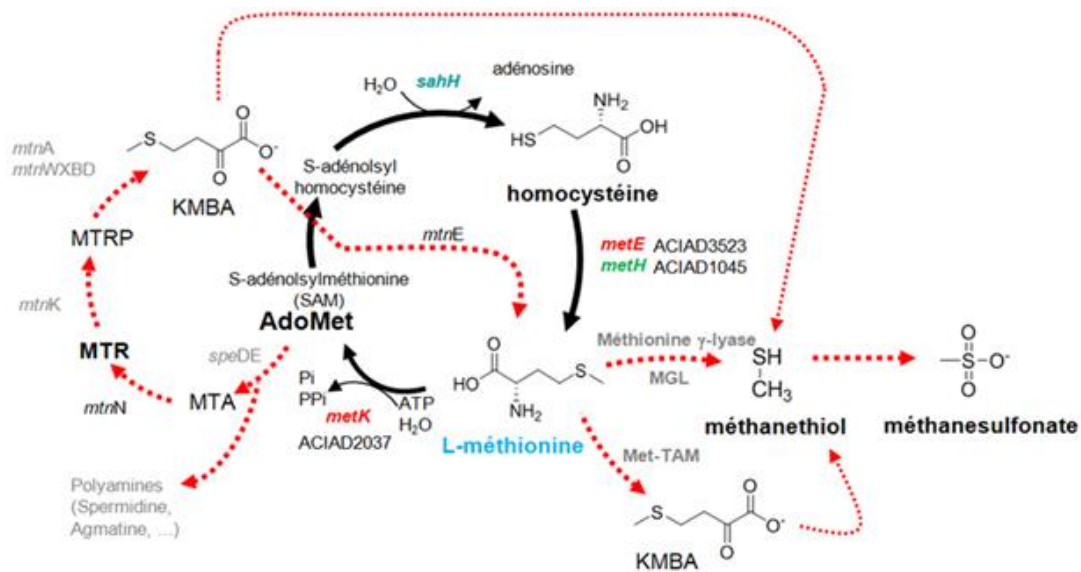


Figure 130 Cycles du méthyl activé (AdoMet) et du MTA pour le recyclage de la méthionine chez ADP1. Les voies indiquées en rouge restent des voies hypothétiques.

À ce stade de l'exploration, il m'était impossible d'établir quelle voie et quelles enzymes permettent chez ADP1 de passer du méthaneéthiol à la formation de méthanesulfonate. D'après l'étude bibliographique réalisée, le DMS s'avérait être un intermédiaire et candidat sérieux de cette voie de recyclage. Cependant, aucun homologue de l'enzyme MddA de *P. deceptionensis*, une méthaneéthiol S-méthyltransférase permettant la formation de DMS à partir de méthaneéthiol, n'a été trouvée chez ADP1. Le DMS est par ailleurs un produit hautement inflammable, extrêmement volatil, toxique, non miscible dans l'eau et difficile à manipuler en conditions stériles avec l'équipement du laboratoire. Il a donc été décidé d'effectuer une étude de transcriptomique sur ADP1 en présence des différentes sources de soufre pour essayer d'identifier les gènes sollicités dans le cadre du recyclage de la méthionine. Cette étude devrait également révéler l'ensemble des gènes co-régulés en présence de méthionine qui correspondraient aux « Sulfate Starvation Induced » protéines d'ADP1. Nous allons donc désormais discuter les résultats de cette étude transcriptomique.

3.2.5 Etude du métabolisme de la méthionine chez ADP1 par une approche transcriptomique

Comme nous l'avons plusieurs fois évoqué, chez la plupart des organismes les gènes impliqués dans l'assimilation des sources de soufre en condition limitante en sulfate sont co-régulés et exprimés dans ces conditions. Une étude du transcriptome devrait nous révéler l'ensemble des gènes impliqués dans le recyclage de la L-méthionine ainsi que plus largement les protéines du type « sulfate starvation-induced (SSI) proteins ». Le transcriptome constitue l'ensemble des ARNm ou transcrits présents dans une cellule ou une population de cellules dans des conditions données et à un instant « t ». Ces dernières années, le séquençage à haut débit de transcriptomes, aussi appelé mRNA-seq, a bouleversé les analyses quantitatives et qualitatives de ces derniers, qu'ils soient procaryotes ou eucaryotes. Le

but de l'approche transcriptomique de l'étude du métabolisme du S chez ADP1 a été évoqué ci-dessus, et pour cela, nous avons réalisé des analyses d'expression différentielle en estimant l'abondance relative des transcrits et en identifiant les gènes exprimés de manière différentielle parmi différents groupes (ici des cultures d'ADP1) sur différentes sources de S. Nous avons choisi 3 sources de S différentes (soit 3 conditions) afin de discriminer les gènes les plus sollicités pour chacune d'entre elles : le sulfate, notre témoin de référence d'expression génique ; la cystéine, en amont de la voie de biosynthèse de la L-méthionine mais en aval de la réduction des sulfites ; et la méthionine, afin d'obtenir des indices quant aux enzymes et à la voie utilisées pour son recyclage.

3.2.5.1 Obtention des données de transcriptomique avec sulfate versus méthionine ou cystéine comme source de soufre

- Extractions des ARNm avec sulfate, cystéine ou méthionine comme source de S

À mon arrivée au laboratoire, deux études de transcriptomique sur d'autres organismes qu'ADP1 étaient en cours selon des protocoles différents et j'ai profité de cette période pour me familiariser avec la technique. J'ai adapté ces deux protocoles pour aboutir à un protocole optimal pour ADP1. Il y a une dizaine d'année, des études de transcriptomique avaient été réalisées sur ADP1 (stress thermique, croissance sur quinate comme source de carbone versus succinate³⁷⁷) mais le chercheur ayant quitté le laboratoire et les kits d'extraction ayant beaucoup changé, nous avons décidé d'optimiser les protocoles en vigueur aujourd'hui au Genoscope (Centre National de Séquençage). Les extractions d'ARN sont faites au laboratoire mais la qualité de mes échantillons a été systématiquement réévaluée par l'équipe de séquençage du Genoscope, qui est également en charge de la préparation des banques d'ARN pour leur séquençage selon les procédures usuelles des différents projets de séquençage (afin de correspondre aux standards en vigueur au Genoscope).

Ainsi, après plusieurs étapes de mise au point pour adapter à ADP1 le protocole d'extraction, j'ai réalisé les extractions d'ARN dans les trois conditions citées précédemment. Afin d'obtenir un résultat statistique satisfaisant, celles-ci ont été réalisées en triplicats biologiques pour chaque source de S, donnant lieu à la constitution de 9 banques ARNm au total représentant 27 extractions individuelles. Brièvement, pour chaque condition, une préculture d'ADP1 est réalisée sur la nuit sur la source de soufre étudiée, puis celle-ci est utilisée pour ensemercer une culture dont la croissance est stoppée à DO = 0,8 (figure 131). Les ARN sont alors extraits à l'aide du kit TRIzol™, puis traités via une DNAase et purifiés à l'aide du kit ZymoClean™, qui permet également de séparer les petits ARN (<200 nt) des autres ARN. La qualité et la quantité des ARN traités au cours de ces étapes a été contrôlée via l'appareil NanoDrop (via les rapports de DO 260/280 et 260/230), ainsi qu'en déposant les ARN purifiés sur gel d'agarose. Les différents échantillons sont ensuite transmis au Laboratoire de Séquençage (LS) qui procède à une vérification plus précise de la qualité et de la quantité d'ARN via le fluorimètre Qubit et l'appareil Bioanalyser. Une déplétion des ARN ribosomiaux est ensuite effectuée puis, en fonction de la quantité d'ARN restant (cf. annexe 9), le LS choisit de préparer les échantillons selon le protocole TruSeq® ou SMARTer® avant séquençage Illumina au sein même du Genoscope. Dans le cas présent, avec au moins plus d'une centaine de ng d'ARN par échantillon, tous ont été traités avec le protocole TruSeq.

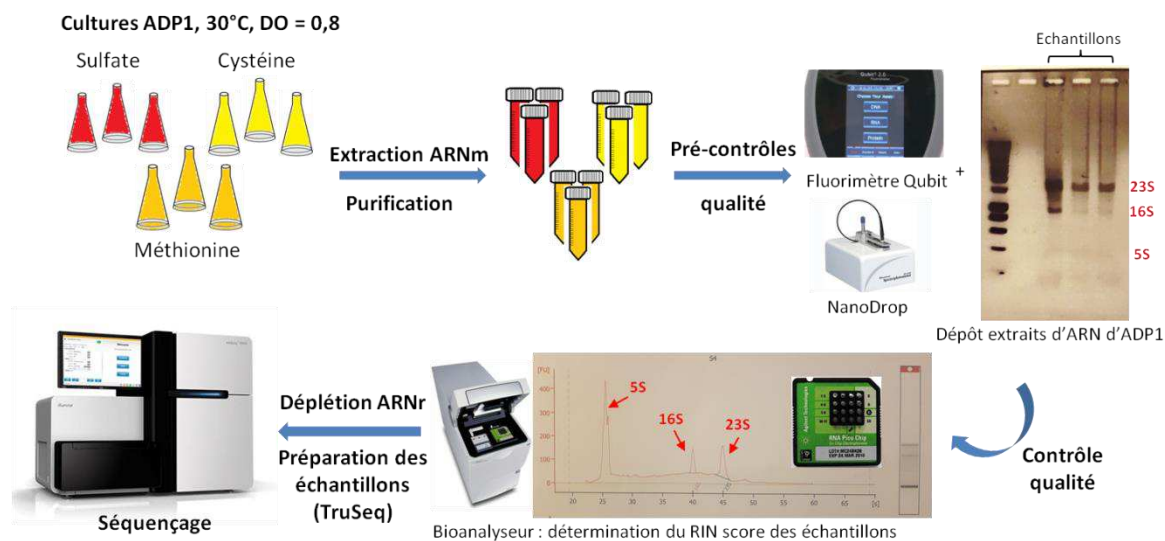


Figure 131 : Principe général du protocole d'extraction de transcriptomes issus de cultures d'ADP1 sur différentes sources de soufre.

- Traitement des données de séquençage

Après séquençage Illumina HiSeq 4000, les données des transcriptomes ont été traitées par David Roche (LaBGEM) et intégrées dans la plateforme MicroScope. Pour expliquer dans les grandes lignes la méthode employée, les séquences de chaque transcriptome ont été projetées (étape de « mapping » des séquences) sur le génome d'ADP1, et pour chaque gène le nombre de séquences projetées a été calculé afin d'estimer leur niveau d'expression. Ce nombre a été normalisé en utilisant à la fois les données des triplicatas de banque de cDNA dans chaque condition, le nombre de séquences qui ont été « mappées » sur le génome (cf. annexe 10, 11 et 12 pour la qualité des séquences obtenues) et la taille des gènes. Par exemple, sur les 4.543.139 séquences obtenues dans l'échantillon 1 en sulfate, plus de 99% ont été de qualité suffisante pour être projetées sur le génome d'ADP1. En moyenne, pour tous les échantillons, près de 4 millions de séquences ont été obtenues et la qualité a été homogène, permettant une étude statistique de l'expression. David a utilisé le programme TAMARA (Transcriptome Analyses based on MAssive sequencing of RnAs) intégré dans MicroScope pour traiter les données. Les trois conditions testées ont été ainsi comparées entre elles pour calculer des scores statistiques (padj) de variation d'expression des conditions deux par deux. On considère comme des variations d'expression significantes, lorsque la valeur de ce score Padj est inférieure à 0,05. On considère également qu'un gène n'est pas exprimé dans une condition quand l'expression est estimée avec moins de 20 séquences « mappées » et on considère comme peu exprimé un gène dont l'expression est estimée avec moins de 100 séquences. Par exemple, 354 CDS ne sont pas exprimées en présence de sulfate.

- Pré-analyse : évaluation de l'état de stress des échantillons dans chaque condition

Dans un premier temps, afin d'estimer l'état des cellules lors de l'extraction des ARN, nous avons analysé le niveau d'expression des protéines impliquées dans le stress cellulaire (« heat shock » protéines, protéines chaperones et protéines impliquées dans la lutte contre le stress oxydatif dû aux espèces réactives oxygénées - ROS en anglais pour « Reactive Oxygen Species »). Sur les 55 protéines de stress (annexe 13) dont la liste avait été établie par Véronique dans un précédent projet du

laboratoire, aucune protéine n'a significativement de variation d'expression, ni sur sulfate ni sur L-méthionine.

3.2.5.2 Expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la L-méthionine

Avant de rechercher les gènes impliqués dans le recyclage de la méthionine, nous avons voulu dans un premier temps analyser les résultats des gènes impliqués dans sa biosynthèse pour confronter, encore une fois, notre modèle métabolique prédit par l'annotation aux données expérimentales.

En reprenant les voies métaboliques liées à la méthionine et à la cystéine prédites par l'annotation (Barbe et al., 2004³⁶⁴ ; Bastard & Perret et al., 2017⁶²), l'expression de l'ensemble des 37 gènes impliqués (annexe 14) a été analysée. La majorité des gènes (24 gènes) n'ont pas de variation significative entre les conditions de croissance en présence de sulfate ou L-méthionine. En revanche, 13 gènes ont une expression significativement modifiée (c.-à-d. $P_{adj} \leq 0,05$) en présence de méthionine versus sulfate (tableau 25 ci-dessous) avec, comme attendu, majoritairement une surexpression en condition limitante de sulfate (condition méthionine). À noter qu'un gène est fortement réprimé en présence de méthionine : il s'agit du gène codant pour MetE, qui catalyse la dernière étape de la voie de biosynthèse de la méthionine, permettant ainsi de ne pas continuer à synthétiser cet acide aminé apporté de manière exogène. Le gène adjacent (ACIAD3524), de fonction inconnue mais auxotrophe à la méthionine⁷³, est également très réprimé. À noter que le régulateur MetR est également légèrement réprimé (deux fois moins d'expression) en présence de méthionine.

Name	Product	Methionine				Cysteine			
		baseMeanA (sulfate)	baseMeanB (methionine)	log2 Fold Change	padj	baseMeanA (sulfate)	baseMeanB (methionine)	log2 Fold Change	padj
srpH	serine acetyltransferase	354	1,82E+04	5,69	1,11E-45	388	82	-2,24	1,45E-08
metQ	D-methionine transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	20	5658	8,18	2,21E-68	21	17	-0,32	0,78
metN	D- and L-methionine transport protein (ABC superfamily, atp_bind)	21	5034	7,94	2,30E-66	22	24	7,33E-02	0,98
metI	D- and L-methionine transport protein (ABC superfamily, membrane)	13	3513	8,1	2,48E-66	14	25	0,81	0,39
sahH	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	3403	1752	-0,96	4,05E-02	3724	7792	1,07	9,10E-03
metR	transcriptional regulator	887	396	-1,17	5,18E-03	971	506	-0,94	2,28E-02
cysP/sbp	sulfate transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	482	1,81E+04	5,23	1,83E-41	528	154	-1,78	8,11E-06
cysT	sulfate transport protein (ABC superfamily, membrane)	95	2476	4,7	3,15E-32	104	61	-0,78	0,19
cysW	sulfate transport protein (ABC superfamily, membrane)	148	3295	4,48	1,61E-30	162	105	-0,62	0,32
cysA	sulfate permease A protein, chromate resistance (ABC superfamily, atp_bind)	236	4718	4,32	2,61E-29	258	171	-0,6	0,32
metY	homocysteine synthase	260	9127	5,13	6,80E-39	285	756	1,41	3,79E-04
metE	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	2,57E+04	1268	-4,34	1,54E-33	2,82E+04	5,31E+04	0,91	1,31E-02

Tableau 25 : Gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de la L-méthionine chez ADP1 dont l'expression varie significativement ($P_{adj} < 0,05$) en présence de L-méthionine versus L-sulfate.

Globalement, ces résultats montrent clairement une induction des systèmes de transport des molécules soufrées : ainsi le système d'import de la L-méthionine, transporteurs quasiment pas exprimés en sulfate (gènes *metQNJ*) comme observé chez *E. coli* notamment, est fortement exprimé

en condition limitante de sulfate. Le niveau d'expression des protéines impliquées dans le transport du sulfate (*cysATW-sbp*) et du thiosulfate (*cysATWP*), est très fortement induit également. Chez ADP1, on trouve 3 L-sérine-O-acétyltransférases (2 *SrpH* et *CysE*), mais on constate que seule l'une d'entre elle (*SrpH* ACIAD1584) est fortement induite en présence de L-méthionine. Une analyse biochimique est en cours au laboratoire pour étudier les paramètres cinétiques comparés des trois SAT d'ADP1. Plus globalement, à part cette SAT, et contrairement à *E. coli* chez qui les gènes de biosynthèse de la cystéine du régulon *cys* sont surexprimés en condition limitante, ces gènes chez ADP1 ne sont pas influencés par la source de S. Cette observation a également été décrite chez *P. aeruginosa*⁴²⁸ suggérant une régulation différente de chez *E. coli*.

De manière plus surprenante, le niveau d'expression de *MetY*, annotée comme homocystéine synthase, augmente d'un facteur 30 sur L-méthionine, suggérant une stimulation de la voie de sulfhydratation directe en condition limitante de sulfate. Tandis que l'expression des cystéine synthases ne semble pas affectée par ce substrat. Ces différents niveaux d'expression sont résumés dans la figure 132.

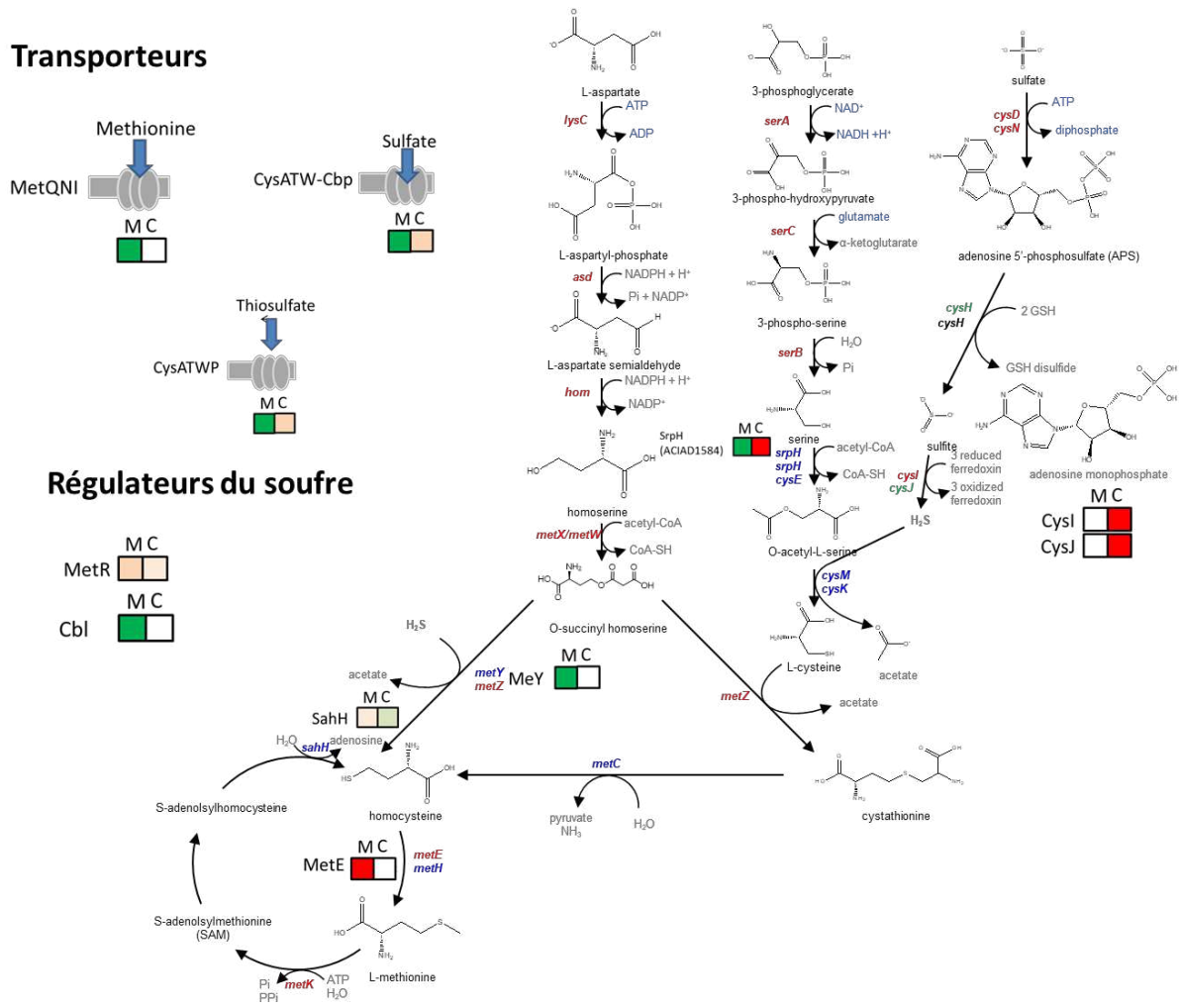


Figure 132 : Vue globale du niveau d'expression en présence de L-méthionine (M) et L-cystéine (C) par comparaison avec le sulfate.

3.2.5.3 Protéines SSI d'ADP1

Les données de l'étude transcriptomique ont fait l'objet d'une étude approfondie mais je me suis concentré dans un premier temps pour ce manuscrit aux variations d'expression entre la L-méthionine et le sulfate comme source de soufre pour essayer de mettre évidence les enzymes impliqués dans son recyclage. Je n'ai utilisé les résultats en présence de L-cystéine qu'en soutien de cette analyse. Nous allons poursuivre et compléter cette analyse pour qu'elle soit intégrée à l'article par la suite.

D'un point de vue général, 270 CDS ne sont pas du tout exprimées sur présence de méthionine en comparaison avec la condition sulfate (354 CDS), révélant une forte régulation de la réponse SSI (protéines induites en situation de carence de sulfate). Plus globalement, il y a 272 CDS ayant une valeur de $P_{adj} \leq 0,05$ lorsque l'on compare l'expression des gènes en présence de L-méthionine vs sulfate, signifiant une variation significative d'un grand nombre de gènes entre ces deux conditions. Parmi ces gènes significativement influencés par l'une ou l'autre de ces conditions, 264 gènes sont plus exprimés (expression au moins x2) en présence de L-méthionine, voire très exprimés. Pour comparaison, dans l'étude de Tralau et al. chez *P. aeruginosa*, 132 gènes étaient surexprimés dans des conditions limitantes de sulfate (mucine comme source de soufre et pas méthionine)⁴²⁸. Ce chiffre est d'autant plus important chez ADP1, que le nombre de CDS chez ADP1 est beaucoup plus petit que celui de *P. aeruginosa* (3325 CDS_{ADP1} versus 5567 CDS_{aeruginosa}). Chez ADP1, 90 gènes sont au moins 5 fois plus exprimés en présence de L-méthionine, dont 55% ne sont quasiment pas transcrits (nombre de lectures « mappées » sur le génome <20) ou peu transcrits (31%) en présence de sulfate (nombre de lectures « mappées » sur le génome <100) (annexe 15). Globalement, 86% des gènes plus surexprimés en présence de L-méthionine sont peu ou pas exprimés en présence de sulfate et même de L-cystéine, mettant en évidence une forte co-régulation de ces gènes. Les gènes les plus transcrits en présence de sulfate sont la L-méthionine synthase MetE et son voisin de fonction inconnue (ACIAD2534) : ils sont presque 2 fois plus transcrits que les deux suivants dans la liste. Ces deux gènes sont exprimés de manière similaire en présence de L-cystéine alors que leur expression est très fortement réduite en présence de L-méthionine.

Un seul gène (ACIAD2980, annoté comme « uncharacterized protein ») est très exprimé dans les deux conditions (L-méthionine et L-cystéine) mais quasiment pas en présence de sulfate. Les prédictions Intepro classent cette protéine membranaire de la famille LysE comme étant un transporteur « amino acid efflux ». Ce gène est conservé en synténie avec un régulateur de transcription chez *P. putida* (PP_3653/3654), mais ne se retrouve que chez ADP1 voisin de deux gènes essentiels sur sulfate (de Berardinis et al., 2008)⁷³, dont la sulfite réductase *cysI*.

L'ensemble des produits de gènes qui sont induits en l'absence de sulfate sont appelés dans la littérature comme nous l'avons évoqué les protéines « SSI », et sont induits par le régulateur CysB chez *E. coli* K12 ou *Pseudomonas putida*⁴²⁹, dont on ne trouve pas d'orthologue chez ADP1. 90 gènes sont induits dans ces conditions chez ADP1, dont la moitié de transporteurs (majoritairement des ABC transporteurs) et 10 oxidoréductases. Ce profil de protéines SSI d'ADP1 est similaire à celui décrit pour *P. aeruginosa* par Tralau et ses collaborateurs en 2007⁴²⁸. Parmi celles-ci, 8 sont annotées ou prédites comme sulfonate monooxygénases, dont SsuD et MsuD, habituellement impliquées dans le métabolisme des sulfonates aliphatiques et esters de sulfonates, respectivement. 89% d'entre eux sont organisés en 7 clusters que nous avons renommés clusters I à VII (tableau 26). Le plus important

d'entre eux, le cluster II, regroupe 30 gènes, et le plus petit, le cluster VI, comporte 3 gènes. Chez *P. aeruginosa*, cette organisation en clusters est également notée par Tralau et al., et 5 « îlots SSI » sont ainsi décrits⁴²⁸. Au regard des annotations ou des prédictions, la moitié des 90 gènes sont clairement liés au métabolisme du soufre ou à son transport. Comme chez *P. aeruginosa* notamment, une dizaine de gènes de la famille COG1960, annotés comme acyl-CoA déshydrogénases ou type DszC impliqués chez d'autres organismes dans la désulfuration, font partie des SSI_{ADP1}.

ADP1 possède un grand nombre de protéines impliquées dans le transport (10,4 % des CDS) comparés aux autres organismes comme *P. aeruginosa* (4,7 %), *E. coli* (5,8 %) ou *Ralstonia solanacearum* (3,9 %) selon l'analyse comparée réalisée par Barbe et al.³⁶⁴ : cela reflète sans doute la flexibilité de la réponse métabolique d'ADP1 aux différentes conditions environnementales, comme cela avait été montré pour les composés aromatiques (Barbe et al., 2004³⁶⁴). La présence de nombreuses protéines de transport et d'enzymes prédites comme impliquées dans la désulfuration de molécules soufrées parmi les protéines SSI révèle sans doute également une grande flexibilité dans l'assimilation des sources de soufre. L'exploration de ces capacités d'assimilation seront illustrées brièvement à la fin de ce manuscrit.

Ces 8 clusters peuvent être décrits, selon le rôle connu de certaines des protéines qu'ils contiennent, comme suit :

- **Cluster I** : il s'agit du cluster de gènes *ssuAABCD*, constituant l'opéron *ssu* codant pour des protéines SSI. Les gènes *ssuAABC* permettent à ADP1 de faire rentrer dans la cellule, via un ABC transporteur, les sulfonates et esters de sulfate de son milieu. *SsuBC* constituent les protéines membranaires fixant l'ATP. *SsuA* est une protéine de liaison périplasmique ; à noter que chez ADP1 un paralogue avec 39% d'identité est adjacent (*ACIAD0037* et *ACIAD0038*). Enfin *ssuD* code pour une alcanesulfonate monooxygénase qui, chez *E. coli*, fonctionne de paire avec l'oxydoréductase *SsuE* pour laquelle il n'existe pas d'homologue chez ADP1.
- **Cluster II** : cluster de « désulfuration », il s'agit du plus grand des clusters avec 30 gènes impliqués majoritairement dans le transport et la désulfuration (4 gènes annotés « Dibenzothiophene desulfurization enzyme »). Il comporte également des enzymes de désulfonation avec 3 sulfonates monooxygénases. Tous les gènes sont annotés comme putatifs.
- **Cluster III** : en lien étroit avec la biosynthèse de la cystéine (présence d'une *SrpH*, l'*ACIAD1584*), ce cluster comporte de nombreuses aryl/alkyl/ester sulfatases et des transporteurs d'aryl/ester sulfates, avec le cluster de gènes *atsABCR*. Aucun de ces gènes n'est essentiel sur sulfate⁷³. *AtsA* est une arylsulfatase, *AtsB* et *AtsC* sont respectivement une perméase et un ABC transporteur d'ester de sulfate ($RO-SO_2-OR'$), et les deux homologues *AtsR* (46% d'identité), codés par les *ACIAD1601* et *ACIAD1593*, sont des protéines périplasmiques de liaison aux esters de sulfate. *AtsB* et *AtsR* possèdent des homologues chez des espèces de *Pseudomonas*, qui sont capables d'utiliser les arylsulfonates et les esters de sulfate contrairement à *E. coli*⁴³⁰. Enfin les *ACIAD1592* et *ACIAD1600*, codant respectivement pour les putatives alcanesulfatases *AtsK-like* et *AtsK*, se sont bien révélées actives sur des alkylsulfates (C5 à C7) lors de tests réalisés avant mon arrivée, ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec *AtsK* de *P. putida* (C4 à C12)⁴³¹. À noter néanmoins que cette étude ne montrait pas d'activité sur taurine.
- **Cluster IV** : il contient des ABC transporteurs de « branched chain amino acid » (BCAA) ou acides aminés ramifiés, qui sont la leucine la valine et l'isoleucine. Ils sont pour la plupart codés par les gènes *braFEG*.
- **Cluster V** : pour le transport de la méthionine notamment (MetQNI), il contient aussi une putative monooxygénase *DszA-like*.
- **Cluster VI** : le plus petit (3 gènes), il contient notamment la putative coenzyme F420-dépendante N5,N10-méthylène tétrahydrométhanoptérine réductase (*ACIAD2536*), avec une potentielle activité monooxygénase.
- **Cluster VII** : impliqué dans le transport de sulfate (*CysTWAP*). Aucun de ces gènes n'est essentiel sur sulfate⁷³. Ce cluster contient aussi le régulateur *Cbl*.

- **Cluster VIII** : ou cluster *msuED*. L'ACIAD3471 est annoté comme étant une putative sulfonate monooxygenase nommée MsuD. La réductase co-localisée MsuE est un gène essentiel sur sulfate, suggérant qu'elle est utilisée au moins aussi avec une autre monooxygenase. Chez les bactéries dans lesquelles le cluster *ssu* est dépourvu de réductase SsuE, il a été montré que MsuE peut remplacer SsuE.

La forte surexpression du cluster VIII contenant MsuED sur L-méthionine indique qu'il est fortement impliqué dans la voie de recyclage de la L-méthionine. Si le méthanesulfonate est le substrat préférentiel de SsuD (MsuD n'a pas été repéré lors du phénotypage) et si MsuD est bien une sulfonate monooxygenase, cette dernière enzyme pourrait être responsable en partie de l'oxydation du méthanethiol en méthanesulfonate. Les intermédiaires possibles de cette voie pourraient être alors le DMS, le DMSO et le DMSO₂. L'exploration de cette hypothèse sera abordée après la fin de l'analyse des données de transcriptomique.

3.2.5.4 Recherche d'un régulateur similaire à CysB

CysB est comme nous l'avons évoqué un régulateur qui induit l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de la L-cystéine en présence de sulfate et regroupés sous le nom de régulon cystéine (régulon *cys*). Chez *E. coli* K12, CysB, régulateur de transcription de la famille LysR, partage 40 % d'identité avec le régulateur secondaire Cbl qui est sous le contrôle positif transcriptionnel de CysB_{K12}. Cbl_{K12} induit les gènes impliqués dans le métabolisme des alcanes sulfonates (clusters *ssu* et *tau*). CysB_{K12} est codé par un gène essentiel sur sulfate⁴³², dont on retrouve des orthologues chez les espèces de *Pseudomonas*. À notre connaissance, aucun régulateur de type Cbl n'a été démontré chez ces espèces. Chez ADP1, aucun régulateur n'a été annoté comme CysB et seul Cbl a été identifié lors de l'annotation. À ce stade, troublé par le fait que chez les deux espèces de *Pseudomonas* un régulateur annoté CysB ait été décrit, nous nous sommes posés la question de la pertinence de l'annotation de l'ACIAD2597 comme Cbl chez ADP1.

Le premier argument en faveur de cette annotation (Cbl_{ADP1}) est la comparaison de séquences avec CysB_{K12} et Cbl_{K12}. L'ACIAD2597 partage 50 % d'identité avec Cbl_{K12} et seulement 45 % avec CysB_{K12} comme le montre la figure 133. Cette figure montre également que Cbl_{ADP1} n'a pas de paralogue. À l'inverse, chez *P. putida* ou *P. aeruginosa*, CysB est le meilleur hit avec leur régulateur (figure 133).

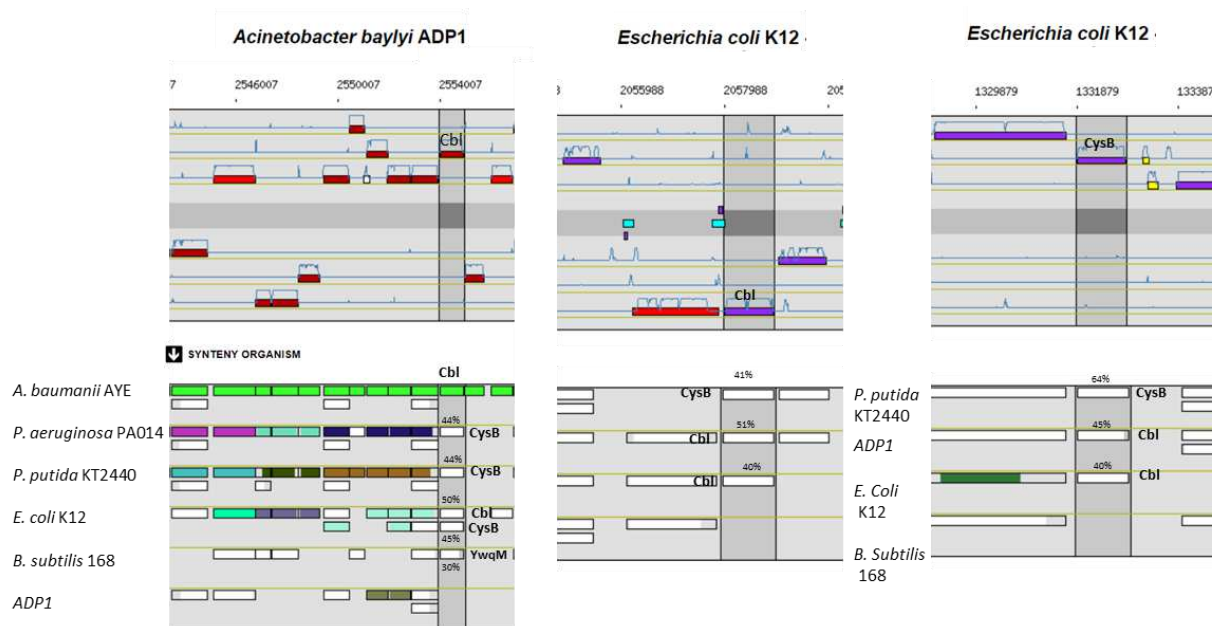


Figure 133 : Homologues des régulateurs transcriptionnels CysB et Cbl entre ADP1, K12 et autres bactéries modèles. Les groupes de synténies ont été analysés via MicroScope/MaGe.

De plus, Cbl_{ADP1} ne possède que 135 résidus identiques (+ 107 résidus similaires) avec CysB_{K12} contre 153 résidus identiques (+ 110 résidus similaires) avec Cbl_{K12} (cf. figure 134). À titre de comparaison, Cbl_{K12} possède 129 résidus identiques (+ 112 résidus similaires) avec CysB_{K12} avec globalement 40 % d'identité (alignement via Uniprot).

Une analyse plus précise de la séquence en incluant cette fois plusieurs CysB et Cbl décrites dans la littérature permet de montrer des similitudes plus grandes de l'ACIAD2597 avec des Cbl, que ce soit globalement en terme de % d'identité (cf. figure 134 et tableau 27) qu'en terme de conservation locale d'acides aminés (les résidus conservés spécifiquement chez 3 CysB connues sont surlignées en rouge alors que ceux conservés chez les Cbl connues ont surlignées en vert sur la figure 134).

En recherchant ensuite des arguments en faveur d'une annotation CysB de l'ACIAD2597, nous avons pu mettre en évidence chez Cbl_{ADP1} l'existence d'un site de fixation au SO₄²⁻ et NAS comme chez CysB *Salmonella typhimurium* (montré par Mittal et al., 2017), site qui semble être partagé par les Cbl (figure 134).

Site 1 de CysB : fixation SO4 et NAS

- * T100, T102, T149, T202 : site 1 fixation du sulfate de CysB_{salmonella} (Mittal et al., 2017)
- * A148, P131, I147, W166, F201, T270 (Mittal et al., 2017)
- Autres résidus du site 1 : Q : Q103, H : H101, E : E150

Site 2 de CysB : site fixation secondaire NAS, fixation OAS

- Hydrophobic region : M246Y, Y106, Y164, F291, K324, A107Y

- En rouge absent chez ADP1

↔ Régions DNA binding chez CysBK₁₂ (Loshowska et al., 2001)
 ↔ Régions impliquée dans la dimerisation Leu41 à I48 chez CysBK₁₂ (Loshowska et al., 2001)
 Y27 : Positive Control Function in CysB_{K12} (Loshowska et al., 2001)



Figure 134 : Alignements multiples des CysB et Cbl connues

		CysB				Cbl			
		B31WT2	P0A9F3	P45600	P06614	Q47083	Q08598	Q6F9A7	B4E8S9
B31WT2	<i>P. putida</i>	100	64	64	65	41	41	44	50
P0A9F3	<i>E. coli</i>	64	100	94	95	41	40	43	48
P45600	<i>K. pneumoniae</i>	64	94	100	95	40	39	42	48
P06614	<i>S. typhimurium</i>	65	95	95	100	41	41	43	47
Q47083	<i>E. coli</i>	41	41	40	41	100	86	50	54
Q08598	<i>K. pneumoniae</i>	41	40	39	41	86	100	52	53
Q6F9A7	ADP1	44	43	42	43	50	52	100	54
B4E8S9	<i>B. cenocepaea</i>	50	48	48	47	54	53	54	100

Tableau 27 : Pourcentages d'identité entre CysB et Cbl connues.

En effet, Mittal et ses collaborateurs ont, à partir de la structure de CysB_{typhimurium}, identifié les sites de fixation des effecteurs de ce régulateur. Deux sites ont été identifiés, dont le site 1 principal qui permet la fixation du sulfate et du NAS (figure 134 ci-dessus). Les 4 thréonines (T100, T102, T149, T202) et les 6 résidus qui se fixent à l'oxygène de SO₄²⁻ (A148, P131, I147, W166, F201, T270) sont parfaitement conservés chez ADP1, mais moins parfaitement chez Cbl_{coli} par exemple. Par contre, seulement 2 des 4 résidus hydrophobes (Y164, F291) se trouvent chez Cbl_{ADP1}. Pour comparaison, un seul de ces résidus hydrophobes ne se retrouve conservé chez Cbl_{coli}. On retrouve également très conservé entre les CysB et les Cbl, le domaine de fixation du régulateur à l'ADN avec le résidu Y27 (très

conservé), ainsi que la région impliquée dans la dimérisation de CysB_{coli} (Leu41 à 148) décrite par Lochowska et al. (2001), conservée chez Cbl_{ADP1} et Cbl_{coli}. En outre, en comparaison avec CysB_{typhimurium}, la protéine Cbl_{ADP1} comme SsuR (Cbl de *Burkholderia cenocepacia*) est plus courte et semble dépourvue de la partie C-ter impliquée dans la liaison de CysB à l'ADN, ainsi qu'à son oligomérisation²⁵.

Enfin, une comparaison avec la Cbl étudiée chez *Burkholderia* par Iwanicka et al. montre que non seulement Cbl_{ADP1} partage 55% d'identité avec Cbl_{Burkholderia} (Uniprot ID : B4E8S9), mais qu'il y a une conservation de synténie entre les deux clusters CysPTWA/Cbl d'ADP1 et CysSbpTWA/SsuR (Cbl-like) de *Burkholderia*¹² (figure 135). Cette synténie n'est pas conservée chez *P. putida* ou *P. aeruginosa*. À noter que les auteurs ont appelé le régulateur Cbl de *Burkholderia* SsuR car le nom de *cbl* était déjà utilisé pour un autre gène dans ce génome. Il ne faut donc cependant pas confondre avec SsuR, régulateur de l'opéron *ssu* de *C. glutamicum*.

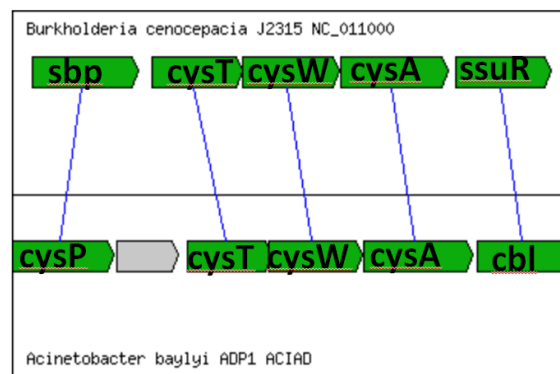


Figure 135 : Conservation de synténie entre le cluster de gène Cbl chez *B. cenocepacia* et ADP1. Analyse réalisée via MicroScope/MaGe.

Pour conclure cet argumentaire en faveur d'une protéine Cbl chez ADP1, et en cohérence avec l'hypothèse selon laquelle l'ACIAD2597 est bien une Cbl telle que celle décrite chez *E. coli*⁴³³, *cbl*_{ADP1} est fortement exprimée en présence de L-méthionine (X 16) alors qu'il n'est que peu exprimé en présence de sulfate (ou de L-cystéine). De plus, ce n'est pas un gène essentiel sur sulfate comme le serait un régulateur de type CysB. L'ensemble de ces arguments sont en faveur de l'annotation Cbl de l'ACIAD2597, même si son rôle demanderait à être approfondi.

La question se pose alors de savoir sous quel régulateur transcriptionnel positif se trouve Cbl_{ADP1}? Peut-on trouver un régulateur transcriptionnel de la famille LysR (régulateurs qui ont un site d'attachement à l'ADN en N-ter et un site de fixation d'un coeffecteur en C-ter), dont le gène serait très exprimé en présence de sulfate et qui serait probablement essentiel sur sulfate? Chez ADP1 il y a 18 CDS annotées ou prédites comme impliquées dans la régulation et essentielles sur sulfate (de Berardinis et al., 2008⁷³). L'analyse de ces CDS a réduit cette liste à 5 le nombre de ces régulateurs appartenant à la famille LysR. Trois d'entre eux (ACIAD0461, ACIAD2511 et ACIAD1539) sont conservés en synténie avec les clusters de gènes *leuBCD*, *atoABDE* et *tcuABC*, les excluant des candidats potentiels. Le quatrième n'est autre que MetR, régulateur positif de type LysR de certains gènes (*metA*, *metH*, *metF*, *metE*) de la biosynthèse de la L-méthionine chez *E. coli* qui peut fixer l'homocystéine, substrat de MetE. Les données de transcription de MetR_{ADP1}, ne montrent pas un changement

drastique d'expression dans les différentes conditions, mais son niveau d'expression, qui est modéré en présence de sulfate, est quand même divisé par deux en présence de L-méthionine. Chez ADP1, MetR n'est pas adjacent à MetE (ACIAD3523) comme chez *E. coli* mais isolé dans le génome et il n'y a pas d'homologue à MetJ_{coli} chez ADP1 ni *P. putida* (analyse via MicroScope). Le gène adjacent à MetE est un gène de fonction inconnue appartenant à une famille DUF (DUF1852), effectivement très souvent trouvé co-localisé avec MetE et auxotrophe à la méthionine (de Berardinis et al., 2008). Ces deux gènes sont les gènes les plus réprimés en présence de méthionine (X 16). Aucune signature protéique ne le prédit comme régulateur. Enfin, le dernier candidat pour un régulateur de type CysB est l'ACIAD0746, co-localisé avec une ferredoxin--NADP+ réductase. Figfam prédit qu'il s'agit de « Regulatory protein CysB » FIG025226. Nous ne pouvons comparer avec confiance les niveaux d'expression qui sont assez similaires car la valeur de Padj n'est pas significative (Padj=0,8) et ne pouvons en conséquence conclure sur ce régulateur.

Finalement, des analyses supplémentaires devront être entreprises pour étudier les deux candidats identifiés ici.

3.2.5.5 *Corrélation entre source de soufre et métabolisme du fer chez ADP1*

Il y a 25 gènes qui sont exprimés en présence de sulfate (avec un nombre de lectures « mappées » sur le génome >100) mais qui le sont au moins 3 fois moins en présence de L-méthionine (cf. annexe 16). La moitié de ces gènes sont impliqués dans l'import de fer et, selon l'annotation des gènes, plus particulièrement dans la synthèse de sidérophores. Des études ont déjà mis en évidence une corrélation entre le métabolisme du soufre et des protéines impliquées dans l'import/acquisition du fer, comme celui de la production de sidérophores contenant du soufre, mais le mécanisme de régulation ne semble pas avoir été élucidé⁴³⁴. Chez ADP1, les fimbactines sont des sidérophores (cf. section 1.4.2 de l'introduction) produits par les gènes *fb*s (cluster de gène ACIAD2761 à 2778). On peut voir ici que la majorité de ces gènes est impactée par le changement de source de soufre (tableau 28) et ont globalement un niveau d'expression plus fort en présence de sulfate, en particulier l'expression du récepteur FbsN (ACIAD2764).

ACIAD ID	Nom du gène	Annotation	Methionine versus Sulfate		Cysteine versus Sulfate	
			log2 fold change	Valeur de Padj	log2 fold change	Valeur de Padj
ACIAD2761	fbsQ	putative multidrug resistance pump	-3,63	3,19E-19	-4,04	5,36E-23
ACIAD2762	fbsP	siderophore-interacting protein	-4,23	4,15E-24	-4,54	1,37E-27
ACIAD2763	fbsO	putative transport protein (MFS superfamily)	-4,57	6,62E-25	-5,08	5,00E-30
ACIAD2764	fbsN	putative ferric siderophore receptor protein	-5,74	1,53E-41	-6,52	2,73E-49
ACIAD2765	fbsM	putative thioesterase	-3,05	1,09E-09	-4,77	1,94E-17
ACIAD2766	fbsL	phosphopantetheinyl transferase component of siderophore synthetase	-2,03	2,94E-03	-3,27	2,70E-06
ACIAD2767	fbsK	putative siderophore biosynthesis protein; putative acetyltransferase	-0,38	0,74	-0,65	0,33
ACIAD2768	fbsJ	putative ornithine decarboxylase	-0,55	0,51	-1,07	3,84E-02
ACIAD2769	fbsI	putative siderophore biosynthesis protein; putative Lysine/ornithine N-monooxygenase	-0,42	0,69	-1,06	3,99E-02
ACIAD2770	fbsH	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	-1,09	9,04E-02	-1,31	1,56E-02
ACIAD2771	fbsG	putative non-ribosomal peptide synthetase with phosphopantetheine-binding domain	-1,18	4,09E-02	-1,82	1,08E-04
ACIAD2772	fbsF	putative non-ribosomal peptide synthetase with condensation, AMP-binding and phosphopantetheine-binding domains	-1,93	1,95E-05	-2,63	4,99E-10
ACIAD2773	fbsE	non-ribosomal peptide synthetase	-2,48	9,65E-08	-3,39	1,16E-13
ACIAD2774	fbsD	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	-3,18	1,56E-09	-3,48	6,06E-11
ACIAD2775	fbsC	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate synthetase, isochorismatase	-3,13	1,00E-07	-3,05	1,24E-07
ACIAD2776	fbsB	isochorismate synthetase	-4,07	1,10E-10	-3,82	4,99E-10
ACIAD2778	fbsA	transcriptional regulator (AraC family)	-0,59	0,53	-1,96	6,01E-05

Tableau 28 : Modification des niveaux d'expression du cluster de gènes impliqués dans la synthèse des fimbactines.

Cependant, contrairement à ce qui a été décrit chez les autres organismes, cette famille de sidérophore ne contient pas de soufre (figure 136). Par ailleurs, la biosynthèse de ce sidérophore est également fortement réduite en présence de L-cystéine et, dans les deux cas, c'est l'expression du récepteur au fer qui est le plus impacté.

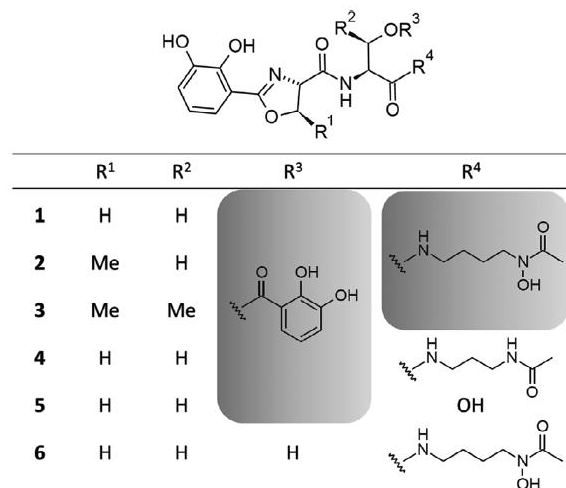


Figure 136 : Structures des fimsbactines A à F d'ADP1 (issu de Proschak et al., 2013)

On peut noter que le deuxième cluster de gènes d'ADP1 (ACIAD2116 à 2124) impliqué dans la synthèse du sidérophore baumannoferrin⁴³⁵, sidérophore également non soufré, n'est impacté qu'en présence de L-cystéine montrant une régulation différentielle de ces deux sidérophores. Parmi les 25 protéines à l'expression fortement inhibée, on trouve 4 autres récepteurs au fer (ACIAD0532, ACIAD1240, ACIAD1460 et ACIAD2325), dont 3 à l'expression très fortement altérée sur L-cystéine, renforçant l'idée d'une réponse concertée de l'acquisition du fer.

À l'inverse, le transporteur TatABC (ACIAD1520-1522) ainsi que le récepteur en amont (ACIAD1516), annoté comme « ferric enterobactin receptor protein », sont très fortement exprimés en présence de L-méthionine (x36) alors que les gènes ne sont quasiment pas exprimés en présence de sulfate (ou de L-cystéine). TatABC est un transporteur de la famille des « Twin Arginine Translocation (TAT) secretory apparatus », qui permettent la sécrétion des protéines à travers la membrane cytoplasmique, notamment celles impliquées dans l'acquisition du fer. Il est à noter que l'on trouve un deuxième transporteur TatABC (ACIAD1521 à 1523) homologue à celui-ci (entre 50 et 60 % d'identité) mais dont l'expression ne varie pas en présence de L-méthionine.

Enfin, l'analyse du transcriptome a permis de faire apparaître un lien entre les ferredoxines et la réduction des sulfites. ADP1 produit du soufre réduit grâce à sa sulfite réductase CysIJ comme évoqué précédemment, *cysI* (ACIAD2982) étant essentiel sur sulfate mais pas *cysJ* (ACIAD0799). Le rôle de CysJ est pourtant primordial car cette flavoprotéine, qui n'est autre qu'une sous-unité du complexe CysIJ, transfère les électrons du NADPH à la sous-unité CysI. Chez les plantes, CysJ est absente et c'est une ferredoxine qui permet le transfert de ces électrons⁴³⁶. Chez *P. putida*, il a été montré que le gène *fprA* (sans doute PP1638), codant pour une ferredoxin:NADP⁺ oxidoréductase, est nécessaire pour l'assimilation des sulfates et plus particulièrement la réduction des sulfites⁴³⁷. Il existe deux paralogues à *fprA* chez ADP1 : ce sont deux gènes *fpr* correspondant à l'ACIAD2244 (69 % d'identité) et à l'ACIAD0747 (41 %), tous deux essentiels sur sulfate. Seul le dernier a une conservation de synténie avec *P. putida*, chez qui *fprA* est co-localisé avec le gène codant pour le régulateur FinR⁴³⁷. L'ACIAD0747 est peu exprimé quelque soit la condition étudiée, tandis que le second est, à l'image de CysJ, exprimé sur sulfate et méthionine mais se trouve fortement réprimé sur L-cystéine (tableau 29). Ces différentes observations laissent supposer que la voie de réduction des sulfites chez ADP1 serait biochimiquement plus proche de celle observée chez les plantes et déjà mise en évidence chez quelques Pseudomonadales.

Label	Name	Product	Methionine vs Sulfate				Cysteine vs sulfate				Cysteine vs Méthionine			
			baseMeanA (sulfate)	baseMeanB (methionine)	log ₂ FoldChange	padj	baseMeanA (Sulfates)	baseMeanB (L-cystéine)	log ₂ FoldChange	padj	baseMeanA (methionine)	baseMeanB (L-cystéine)	log ₂ FoldChange	padj
ACIAD0747	<i>fpr</i>	ferredoxin--NADP+ reductase bifunctional protein, Includes: sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component; iron-uptake factor	129	114	-0,18	1	141	170	0,26	0,74	116	154	0,41	0,34
ACIAD0799	<i>cysJ</i>		1585	1255	-0,34	1	1730	240	-2,85	1,19E-13	1283	218	-2,56	3,51E-24
ACIAD2244	<i>fpr</i>	ferredoxin--NADP+ reductase	1560	2417	0,63	0	1705	609	-1,49	1,99E-04	2471	553	-2,16	4,25E-21

Tableau 29 : Expression différentielle des gènes impliqués dans la réduction des sulfites chez ADP1.

3.2.6 Recyclage de la L-méthionine via le DMSO puis le méthanesulfonate ?

Les données de transcriptomique ont révélé l'implication d'un certain nombre de monoxygénases parmi les SSI et notamment MsuD, qui a été décrite comme étant capable d'oxyder le DSMO et le DMSO₂. Nous nous sommes donc demandés si ces deux molécules soufrées pouvaient être des intermédiaires de la voie de recyclage de la L-méthionine.

- DMSO et DMSO2 sont-ils des intermédiaires potentiels de la voie de recyclage ?

Afin de valider notre hypothèse concernant les intermédiaires de la voie de recyclage de la méthionine en méthanesulfonate (MSA), nous avons vérifié d'abord que le DMSO et le diméthylsulfone (DMSO2) sont des sources de S chez ADP1 (figure 137). Nous ne pouvions pas tester le DMS au laboratoire et nous nous sommes alors tournés vers le DMSP, précurseur potentiel de DMS (et de DMSO/DMSO2) chez les bactéries du sol bien qu'aucune voie métabolique (cf. introduction) ne soit prédite chez ADP1.

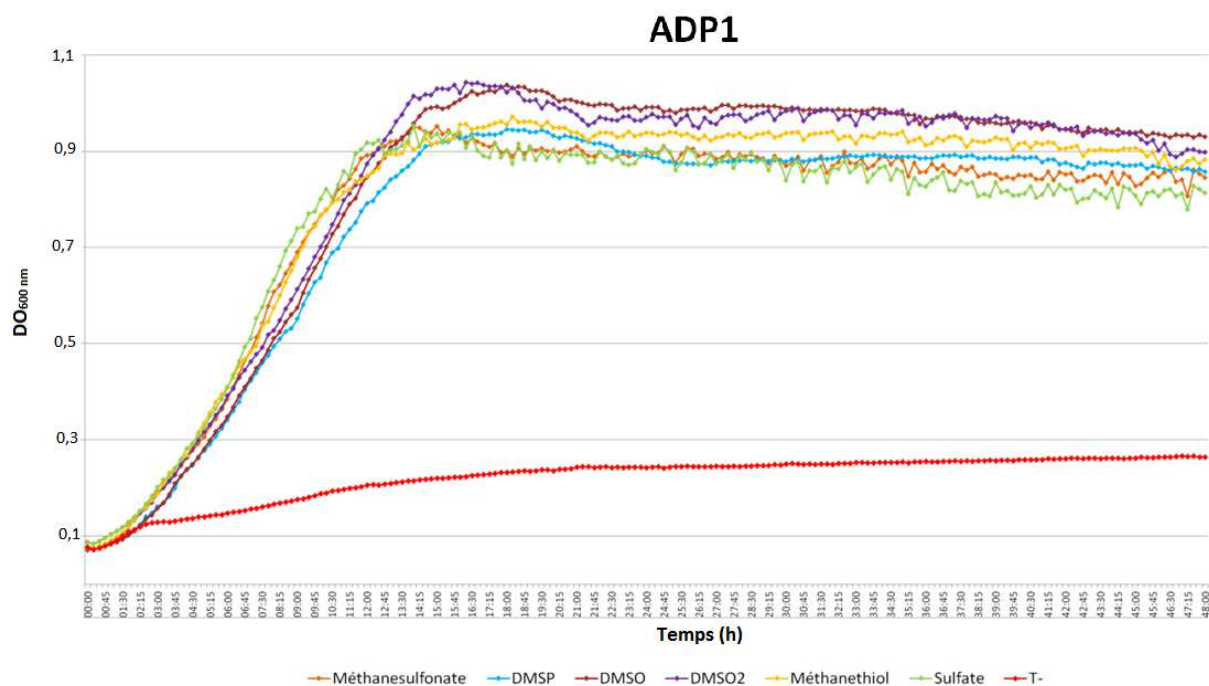


Figure 137 : Cinétiques de croissance de la souche sauvage d'ADP1 sur les possibles intermédiaires de la voie de recyclage de la méthionine et le DMSP (48h).

Le phénotypage d'ADP1 sur DMSO, DMSO2 et DMSP a montré qu'ADP1 est capable d'importer et d'utiliser ces molécules soufrées. Diverses espèces de *Pseudomonas* (dont *P. putida* DS1) sont également capables d'utiliser le DMS et le DMSO comme sources de S comme décrit par Endoh et al⁴³⁸. Il a été démontré que *P. putida* désulfurise le DMS en sulfite via le DMSO, le DMSO2 et le MSA, et que cette voie implique le cluster *ssuEADCBF*. Plus récemment, Kouzuma et al. ont pu montrer que c'est la monooxygénase SfnG (Uniprot ID : Q65YW9) qui catalyse les deux réactions d'oxydation pour transformer le DMSO en MSA chez *P. putida* DS1⁴³⁹ (figure 138).

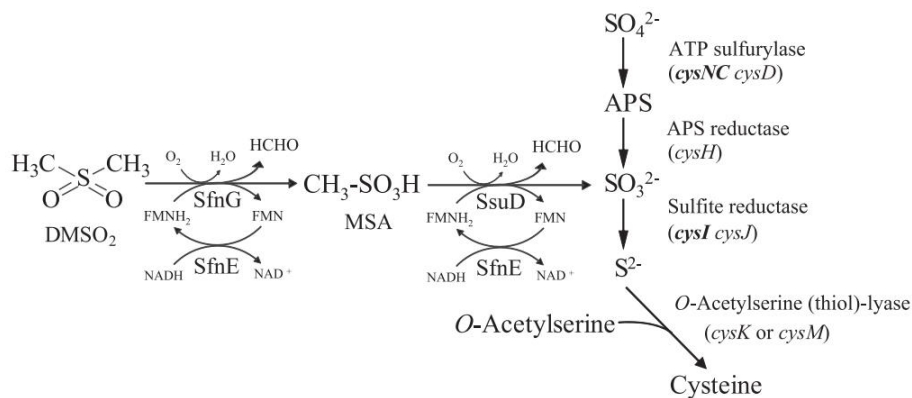


Figure 138 : Oxydation du diméthylsulfone (DMSO₂) en H₂S chez *P. putida* DS1 (issu de Kouzuma et al., 2008).

Le gène codant pour cette enzyme est co-localisé avec sa réductase SfnE (Uniprot ID : Q845S9) avec une synténie faible avec les clusters MsuED chez *P. putida* KT2440 ou ADP1, et ce malgré de forts pourcentages d'identité (95% avec MsuD_{putida} KT2440, PP_2765 ; 81% avec MsuD_{ADP1}, ACIAD3471). Chez *P. putida* DS1, le cluster *ssu* est dépourvu, comme chez ADP1, de *ssuE* et Kouzuma a montré que SfnE (57 % avec MsuE) peut remplacer SsuE auprès de SsuD⁴³⁹. De façon analogue, MsuE pourrait remplacer SsuE chez ADP1 ; à noter d'ailleurs que, curieusement, *msuE* s'est avéré être un gène essentiel sur sulfate chez ADP1. Le régulateur de transcription de SfnEG est SfnR (Uniprot ID : Q845S7 ; 85% d'identité avec PP_2771), qui est sous la régulation positive de CysB. On peut noter que l'orthologue de SfnR chez ADP1 (ACIAD1935) n'a que 48% d'identité et qu'il est conservé en synténie (analyse MicroScope/MaGe) chez de nombreuses espèces avec l'ACIAD1935 du cluster IV (ACIAD1935 à 1942), surexprimé en condition SSI. Comme décrit précédemment, ce cluster semble impliqué dans le transport de BCAA mais aucune monooxygénase n'y est présente. Un autre homologue de SfnR est néanmoins présent chez ADP1 : l'ACIAD1519 (51 % d'homologie) co-localisé avec une putative sulfonate monooxygénase (ACIAD1518) et codant pour un putatif régulateur transcriptionnel sigma-54 dépendant (comme c'est le cas de SfnR⁴⁴⁰). Il se situe quant à lui dans le cluster II des protéines SSI d'ADP1.

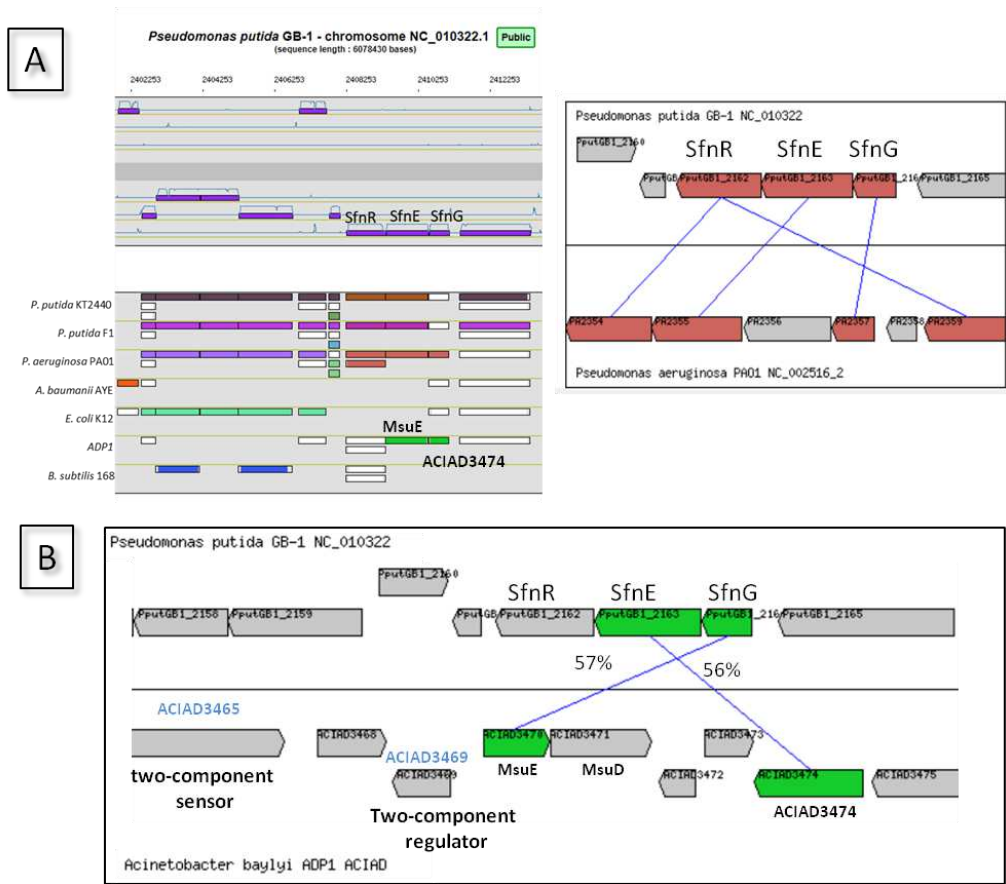


Figure 139 : Recherche des synténies du cluster de gène SfnEG de *P. putida* DS1 (GB1) chez *P. aeruginosa* et ADP1. (A) Conservation du cluster SfnRGD de *P. putida* DS1 chez *P. aeruginosa*, partiellement chez d'autres espèces de *P. putida* et (B) absent chez ADP1.

Les auteurs ont montré que SfnG est une DMSO2 monoxygénase (FMNH2-dépendante) catalysant la conversion du DMSO2 en MSA comme MsuD. Nous nous sommes demandé s'il existait un équivalent du régulateur SfnR en amont du cluster MsuED. On ne trouve pas de régulateur de transcription de type LuxR (comme SfnR) en amont du cluster, mais on trouve deux gènes codant pour un « two-component system » (ACIAD3465(sensor) / ACIAD3469(regulator)). L'étude via MicroScope de ce régulateur montre qu'il est plutôt conservé en synténie en dehors du genre *Acinetobacter*, avec les deux gènes voisins annotés comme transporteurs en amont. Ce résultat, ainsi que le fait que leur niveau d'expression n'est pas altéré par le changement de source de soufre, indiqueraient qu'il ne s'agit pas du régulateur de MsuED. Le niveau d'expression du régulateur de transcription en aval de MsuED mais en amont de l'ACIAD3474 (putative monoxygénase FMNH2-dépendante surexprimée sur méthionine) n'est pas non plus altéré dans les différentes conditions de croissance testées.

- DMSO et DMSO2 sont-ils les réels intermédiaires de la voie de recyclage ?

Les mutants $\Delta cysI$, $\Delta ssuD$ et $\Delta msuD$ ont été choisis pour une étude de phénotypage sur le DMSO et le DMSO₂. L'observation de $\Delta cysI$ permet de surveiller que l'assimilation de ces molécules se fait par l'intermédiaire de sulfites, tandis que les monoxygénases sont suspectées d'intervenir dans la conversion du méthanthiol en sulfites via le MSA. Les courbes de croissance (figure 140) révèlent que le catabolisme du DMSO et DMSO₂ aboutit bien à la production d'H₂S (cf. figure 71 de l'introduction) car le mutant $\Delta cysI$ ne croît pas sur MSA. Par ailleurs, le mutant $\Delta ssuD$ ne croît pas non plus en présence de DMSO₂ et a une pousse très altérée sur DMSO, montrant que l'assimilation du DMSO/DMSO₂ passe sans doute par la production de méthanesulfonate. Le gène *msuD* est essentiel à la croissance du DMSO et DMSO₂, démontrant que cette monoxygénase catalyse au minimum la deuxième réaction (DMSO₂ en méthanesulfonate), et potentiellement les deux oxydations successives.

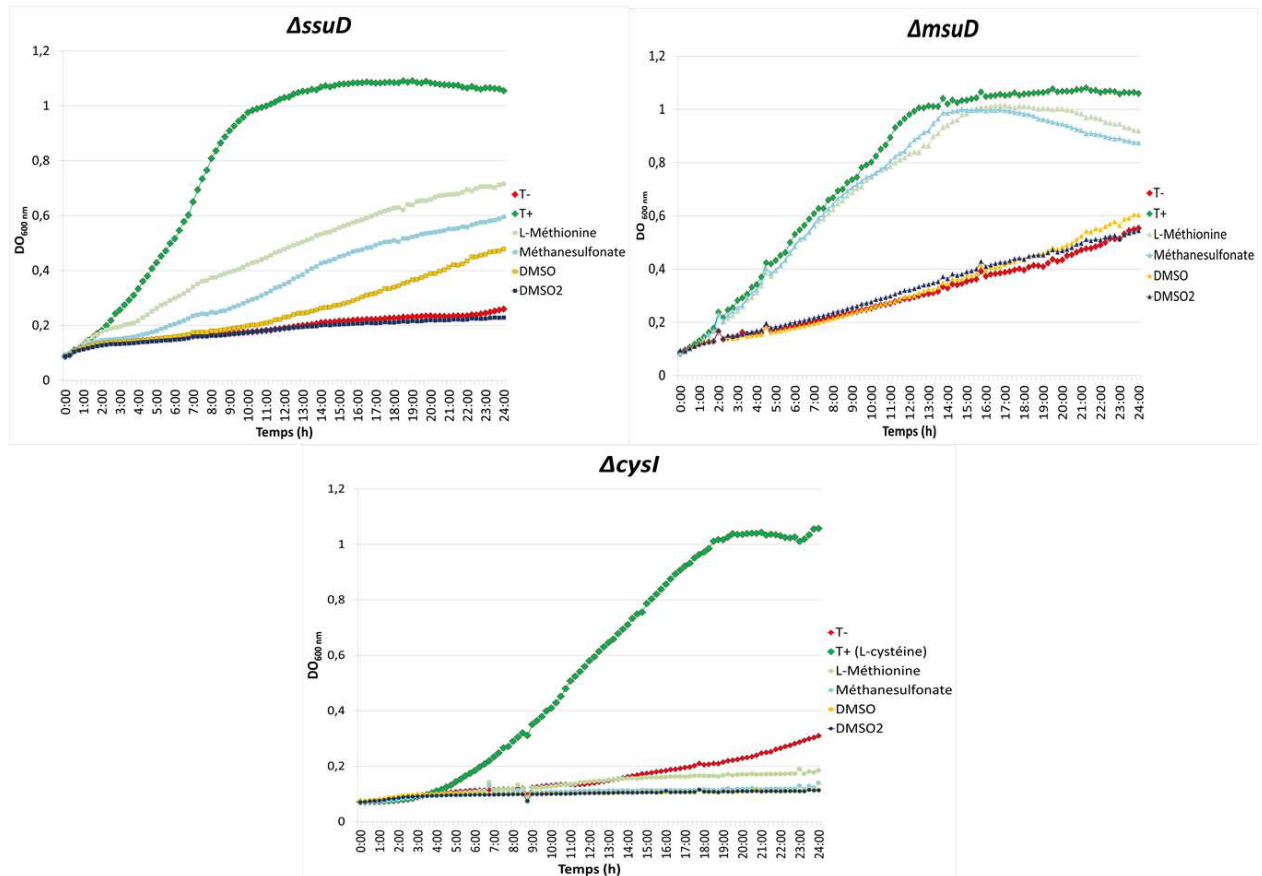


Figure 140 : Cinétiques de croissance des mutants ADP1 $\Delta cysI$, $\Delta ssuD$ et $\Delta msuD$ sur les possibles intermédiaires de la voie de recyclage de la méthionine (24h).

Contrairement à $\Delta ssuD$, la croissance de $\Delta msuD$ ne semble pas affectée sur MSA, signifiant qu'il est peu probable que ce soit *MsuD* qui complémente partiellement la fonction de *SsuD* en son absence sur méthionine. Par contre, $\Delta msuD$ croît aussi bien sur la L-méthionine, révélant malheureusement pour nous que son recyclage n'implique pas *MsuD* et que, par conséquent, il est peu probable que le DMSO ou le DMSO₂ soient des intermédiaires de cette voie. Ainsi, une autre voie

n'impliquant pas MsuD doit exister chez ADP1, permettant de former du MSA à partir du méthanthiol.

Bien que, d'après le transcriptome, MsuD et SsuD soient les monooxygénases les plus fortement exprimées sur L-méthionine (elles ne le sont pas sur sulfate ou cystéine), 7 autres monooxygénases candidates pourraient également être impliquées dans l'assimilation du S à partir de la L-méthionine (tableau 30). Le phénotypage de ces monooxygénases va être entrepris au laboratoire pour rechercher les enzymes de cette voie.

Label	Name	Product	Methionine vs Sulfate				Cysteine vs Methionine			
			baseMeanA (sulfate)	baseMeanB (methionine)	log2 FoldChange	padj	baseMeanA (methionine)	baseMeanB (L-cystéine)	log2 FoldChange	padj
ACIAD0036	ssuD	FMNH(2)-dependent alkanesulfonate monooxygenase	27	1,14E+04	8,74	1,64E-77	1,16E+04	17	-9,43	1,54E-194
ACIAD1518	-	putative sulfonate monooxygenase	19	488	4,71	3,81E-26	498	20	-4,66	1,31E-44
ACIAD1527	-	putative FMNH2-dependent methane/alkanesulfonate monooxygenase	3,02	333	6,78	8,28E-35	341	1,18	-8,17	1,26E-62
ACIAD1535	-	putative FMNH2-dependent monooxygenase (sulfonate),	67	888	3,72	2,09E-20	906	45	-4,33	1,90E-48
ACIAD1595	ntaA	nitrilotriacetate monooxygenase component A (NTA monooxygenase component A) (NTA-MO A)	15	184	3,63	1,69E-14	188	9,56	-4,3	1,50E-30
ACIAD2066	-	putative monooxygenase (DszA-like)	19	8857	8,84	4,89E-77	9046	18	-8,98	2,02E-183
ACIAD2536	-	putative coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase and related flavin-dependent oxidoreductase	33	8593	8	2,21E-68	8786	26	-8,4	4,50E-173
ACIAD3471	MsuD?	putative sulfonate monooxygenase (MsuD)	27	4,16E+04	11	2,62E-114	4,25E+04	21	-11	5,70E-227
ACIAD3474	-	putative FMNH2-dependent monooxygenase	36	1433	5,3	3,62E-37	1465	56	-4,71	1,06E-64

Tableau 30 : Liste des monooxygénases dont l'expression est induite par la présence de L-méthionine chez ADP1.

Puisque nous ne pouvions pas tester le DMS directement, des tests de croissance sur DMSP ont été effectués. La souche sauvage d'ADP1 étant capable de croître sur DMSP et puisqu'aucune voie, encore une fois, n'est prédite chez ADP1 pour assimiler le DMSP, nous avons testé également le MTPA, intermédiaire de la voie d'assimilation du DMSP indépendante du DMS. Le MTPA est également une excellente source de soufre chez ADP1. Comme attendu, le mutant $\Delta cysI$ ne peut pas utiliser le DMSP et le MTPA comme source de soufre, démontrant comme cela est prédit que, quelque soit la voie d'assimilation du DMSP qui existe chez ADP1, elle aboutit aux sulfites. Ceux-ci sont probablement produits via la synthèse de méthanesulfonate car le mutant $\Delta ssuD$ ne peut plus croître sur DMSP (figure 141). La situation pour ce mutant est différente que pour la méthionine car il semble que, dans cette condition (DMSP ou MTPA), il n'y ait pas d'enzyme isofonctionnelle (ou de voie alternative) capable de compenser l'absence de SsuD. Par contre, nous ne pouvons conclure avec certitude quant aux cinétiques de croissance de $\Delta msuD$ car malheureusement un changement de lot d'un produit entrant dans la composition du milieu sans soufre a introduit une contamination que nous n'avons pas pu éliminer pendant le temps restant de mon travail sur les cinétiques. Ces expériences devront être reprises quand le problème sera résolu. Néanmoins, les résultats préliminaires que nous avons obtenus semblent indiquer une croissance altérée en présence de DMSP (normale pendant 15h avec MTPA), semblant indiquer que l'assimilation du DMSP passe au moins partiellement par le DMSO/DMSO₂, voie potentiellement commune à celle du recyclage de la méthionine.

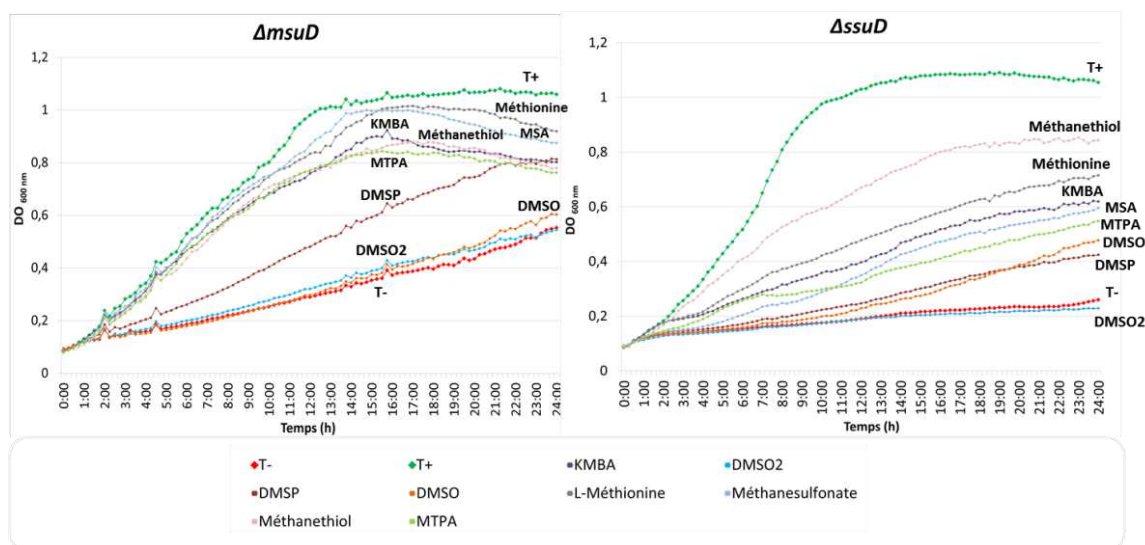


Figure 141 : Cinétiques de croissance sur DMSP et MTPA comparées aux autres sources de S déjà testées sur $\Delta msuD$ et $\Delta ssuD$.

Bien que la croissance d'ADP1 sur DMSP (cf. figure 137) indique qu'elle est capable de le dégrader, aucune enzyme des deux voies n'a été identifiée. C'est donc pour tenter de savoir si les voies de recyclage de la méthionine et du DMSP sont communes ou indépendantes chez ADP1 que nous nous sommes intéressés à la réaction de conversion du méthaneéthiol en DMS chez notre *Pseudomonadale*. En effet, le lien entre les deux voies selon la littérature serait le DMS, formé à partir du méthaneéthiol ou bien du DMSP. Dans cette hypothèse, il devrait exister une voie pour passer du DMS au méthanesulfonate sans passer par le DMSO.

3.2.6.1 Du Méthaneéthiol au DMS chez ADP1

Comme nous l'avons présenté en introduction, le méthaneéthiol peut être transformé en DMS chez les bactéries marines ou du sol sous l'action de MddA, une méthaneéthiol *S*-méthyltransférase codée par un gène essentiel à la synthèse de DMS chez *P. deceptionensis*⁴⁴¹. Une recherche d'homologue à MddA_{*deceptionensis*} (Uniprot ID : A0A0F6P9C0) dans le génome d'ADP1 a été réalisée en suivant plusieurs pistes via MicroScope/MaGe, sans succès (figure 142).

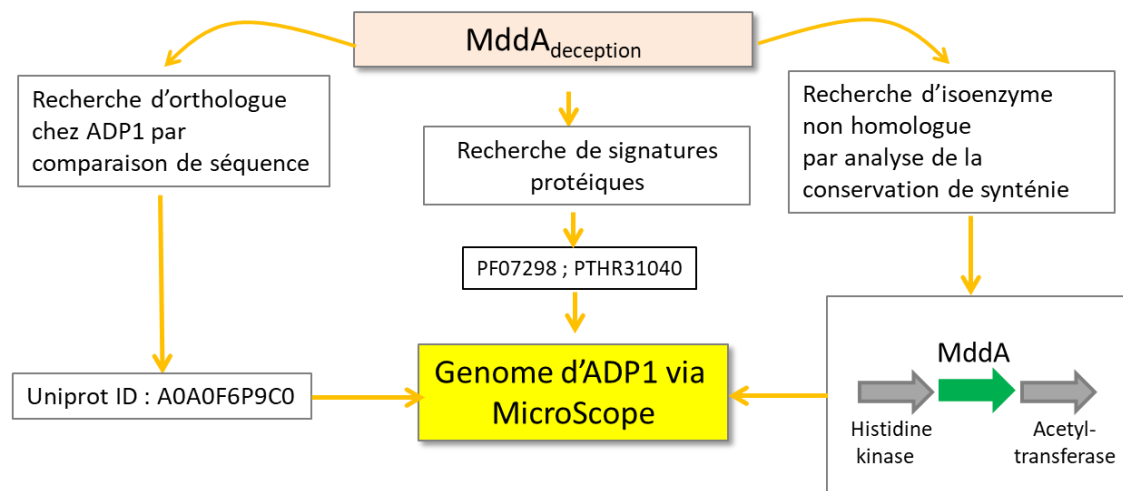


Figure 142 : Stratégies utilisées pour rechercher une méthaneithiol S-méthyltransférase chez ADP1 en utilisant la séquence de MddA caractérisée de *Pseudomonas deceptionensis*. Les analyses ont été réalisées via la plateforme d'annotation MicroScope (www.genoscope.cns.fr/agc/microscope). Le contexte génomique de *P. deceptionensis* a été analysé directement sur la séquence du contig GenBank: KM030271.1.

En effet, la comparaison de séquence par BLAST de MddA_{deceptionensis} avec le génome d'ADP1 via la plateforme MicroScope n'a montré aucun homologue, même faible. De plus, l'analyse du génome d'ADP1 toujours via MicroScope pour essayer de révéler des protéines qui pourraient partager des signatures protéiques avec MddA_{deceptionensis} (Pfam ID : PF07298 et PANTHER ID : PTHR31040) a été réalisée, mais aucun candidat n'a pu être trouvé. Le contexte génomique de MddA a ensuite été comparé au génome d'ADP1 en recherchant les enzymes isofonctionnelles mais qui ne seraient pas homologues, en utilisant les gènes adjacents à *mddA*_{deceptionensis}. Mais aucun des deux gènes n'a d'orthologue chez ADP1 non plus. Il est à noter qu'on ne trouve pas non plus d'orthologue chez toutes les espèces de *Pseudomonas* (ex : *P. putida* KT2440 ou *P. aeruginosa* PA01), mais *mddA* est présent chez d'autres comme *Pseudomonas fluorescens* par exemple.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Carrion et ses collaborateurs qui ont récemment montré que des espèces bactériennes du sol, dont des espèces d'*Acinetobacter*, synthétisent du DMS à partir de méthaneithiol alors qu'aucun gène homologue à *mddA* n'a pu être identifié (Carrion et al. 2017)⁴⁴². Ils ont également montré que cette synthèse était fortement induite par la présence de méthionine ou méthaneithiol comme chez *P. deceptionensis*^{441,442}, laissant imaginer que chez ADP1, le DMS pourrait en effet aussi être un intermédiaire.

MddA de *P. deceptionensis* étant induite en présence de L-méthionine⁴⁴¹, nous sommes revenus aux données de transcriptomique d'ADP1 afin d'essayer d'identifier une méthaneithiol S-méthyltransférase non homologue à MddA, qui aurait pu être induite dans ces conditions chez ADP1. Une seule méthyltransférase a une expression induite (x4) en présence de L-méthionine, l'ACIAD1418. Cette enzyme est annotée comme « putative homocysteine S-methyltransferase family protein » et est co-localisée avec une protéine membranaire de la famille des « amino acid antiporter » (figure 143) également surexprimée. Ainsi, bien qu'il n'y ait pas d'orthologue de MddA chez ADP1, l'ACIAD1418 pourrait être un candidat sérieux. Un très faible homologue, sans conservation de synténie, existe chez *E. coli* : MmuM (Uniprot ID : Q47690, 29% d'identité), qui est impliquée dans la synthèse de méthionine

à partir de S-méthylméthionine et de L-homocystéine. Or, si ACIAD1418 avait la même fonction chez ADP1, il ne serait probablement pas surexprimé sur méthionine.

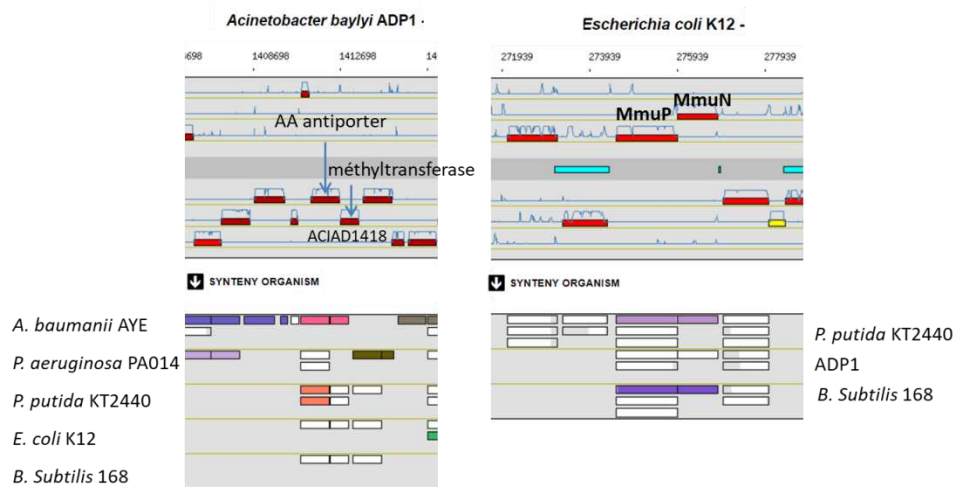


Figure 143 : Cluster de gènes codant pour une S-méthyltransférase et un amino acid transporter induit en présence de L-méthionine. À gauche, contexte génomique chez ADP1 du gène codant pour la putative S-méthyltransférase (ACIAD1418) surexprimée sur L-méthionine (vs sulfate). À droite, contexte génomique chez E. coli K12 des gènes codant pour MmuMP.

Enfin, pour information, des homologues à la diméthyl monooxygénase DmsOa (Uniprot ID : E9JFX9) qui catalyse la formation de méthanethiol à partir de DMS comme celle décrite chez *Hyphomicrobium sulfonivorans* ont été trouvés chez ADP1 : il s'agit des ACIAD2536 et ACIAD2066 citées précédemment, avec 52% et 46% d'identité avec DmsOa, respectivement.

3.2.6.2 Du DMSP au DMS

Comme nous l'avons vu, le DMSP est source de soufre et semble assimilé de manière indépendante de la formation du MTPA (la croissance du mutant $\Delta msuD$ est altérée sur DMSP mais pas sur MTPA). Les seules autres voies décrites à notre connaissance passent toutes par la formation de DMS, soit directement via une DMSP lyase, soit indirectement. L'activité DMSP lyase est catalysée par plusieurs familles d'enzymes comme nous l'avons vu dans l'introduction. Les enzymes DddD de *Marinomonas* (Uniprot ID : A6W2K8) appartenant à la famille des CoA transférases (class III), DddQ de *Ruegeria lacuscaerulensis* (Uniprot ID : D0CY60) et DddW de *Ruegeria pomeroyi* (Uniprot ID : Q5LW89) appartenant à la famille des cupin, DddP de *Roseovarius nubinhibens* (Uniprot ID : A3SK19) appartenant à la famille M24 peptidase, et même Alma1 (Uniprot ID : PODN21), identifiée chez les algues et appartenant à la famille des aspartate racémases, ont été utilisées pour essayer d'identifier un homologue chez ADP1, sans succès.

En 2017, Li et ses collaborateurs⁴⁴³ ont caractérisé une DMSP lyase périplasmique d'*Acinetobacter bereziniae* appartenant à la famille cupin et qui a 80 % d'identité avec DddY

d'*Alcaligenes faecalis* (Uniprot ID : E7DDH2, Curson et al., 2011). Cette enzyme n'a aucune homologie de séquence avec les autres DMSP lyases appartenant à cette famille. On ne trouve aucun orthologue non plus à cette enzyme chez ADP1 (selon une analyse via MicroScope, DddY semble assez peu répandue chez les espèces d'*Acinetobacter* actuellement complètement séquencées). Dans l'article de Li et al. sont décrits deux motifs (1 et 2) qui semblent, selon les auteurs, conservés parmi la famille des cupin malgré la grande diversité de séquences (figure 144).

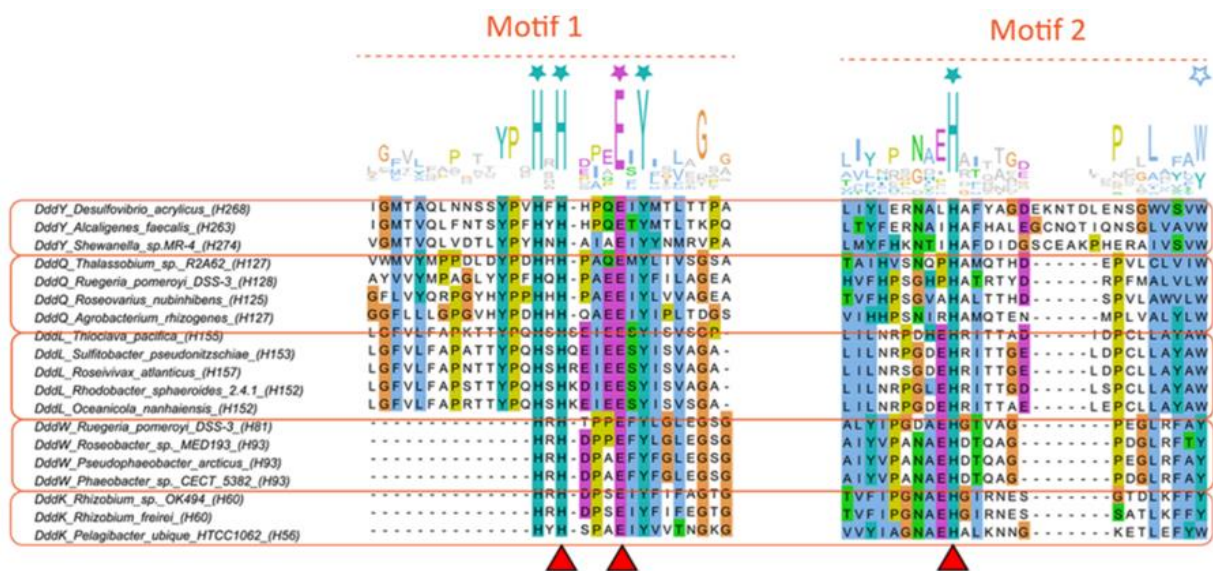


Figure 144 : Motifs conservés par les DMSP lyases de la famille à Cupin (issu de Lei et al., 2018).

Une recherche via MicroScope du motif 1 [HxHxx(x)xExY] commun aux enzymes à cupin identifié par le travail de Tawfick et ses collaborateurs³⁵⁴ a permis d'identifier chez ADP1 une seule protéine, l'ACIAD1652, annotée comme « Uncharacterized protein » et classée selon Pfam comme appartenant à la famille « PF12697 : alpha beta hydrolase family ». Cette protéine n'est pas conservée chez les *Pseudomonas* et ne possède pas d'homologues hors du genre *Acinetobacter*. Cette enzyme devrait être testée prochainement au laboratoire pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Dans le cas où, cette enzyme ne catalyse pas la formation de DMS, un phénotypage de la collection entière de mutant pourrait apporter une réponse. Cependant, les auteurs semblent suggérer que, compte tenu des K_m assez élevés (1 à 10 mM), cette activité est sans doute une activité secondaire. Compte tenu de la diversité des familles capables de catalyser cette réaction, il est peu probable que nous trouvions un gène essentiel sur DMSP chez ADP1.

3.2.7 ADP1 et la diversité des sources de S assimilables

Comme nous l'avons indiqué dans l'analyse transcriptomique, de nombreux transporteurs ainsi que de nombreuses monooxygénases font partie des protéines SSI pouvant être le reflet d'une flexibilité du métabolisme d'ADP1 à assimiler différentes molécules soufrées, capacité déjà illustrée tout au long de ce manuscrit.

Au cours de cette thèse, une trentaine de sources de S potentielles issues de diverses familles chimiques (alkylsulfonates, esters de sulfate, arylsulfates, acides aminés, soufre inorganique, etc...) ont été testées afin d'évaluer le spectre d'assimilation du soufre d'ADP1. L'inventaire de ces sources de soufre potentielles chez ADP1 a été réalisé via les tests de cinétique de croissance en bioscreen, à une concentration de 2 mM. Ainsi, les thiosulfates, la L-cystine et la D/L-lanthionine se sont révélées être d'excellentes sources de soufre. Tout comme la taurine et le cystéate (sulfonates, X-SO₃⁻) et l'hypotaurine (sulfinate, X-SO₂⁻), malgré l'absence chez ADP1 d'hypotaurine déshydrogénase identifiée et l'absence d'opéron *tauABCD* impliqué dans le transport et la métabolisation de la taurine chez *E. coli*. Les autres familles de molécules testées illustrant les larges capacités d'ADP1 à utiliser diverses sources de S comprennent des esters de sulfate, avec l'hexylsulfate ; un arylsulfate, le nitrocatecholsulfate ; et divers autres composés, dont le thiométhoxide de Na⁺ (méthanethiol commercial) ; la L-méthionine sulfone ; la L-cystéine-S-sulfate ; la S-méthylcystéine ; le KMBA ou encore l'acide djenkolique. Quelques composés n'ont cependant pas permis la croissance d'ADP1, dont le dodécyl sulfate (SDS), le D-homocystéate (croissance après 30 h de culture) et dans une moindre mesure la cystéamine et le thionanisole (faible croissance, expérience non dupliquée).

Le tableau 31 permet de résumer l'ensemble des sources de S testées au cours de ma thèse sur la souche sauvage ADP1, ainsi que sur les mutants $\Delta msuD$, $\Delta ssuD$, $\Delta cysI$ et $\Delta cysM$. Ainsi, la plupart des molécules citées dans ce tableau se sont révélées sources de S malgré l'absence de certaines voies métaboliques (anabolique, catabolique ou de recyclage) prévues par l'annotation fonctionnelle du génome d'ADP1. La plupart des molécules semblent assimilées via la formation de sulfites (croissance du mutant $\Delta cysI$ nulle ou très altérée), eux-mêmes utilisés pour la production de L-cystéine comme le montre le comportement de $\Delta cysM$. Cependant, dans certains cas comme avec l'hypotaurine ou l'isethionate, qui sont d'excellentes sources de soufre pour le mutant $\Delta cysM$, l'assimilation des sources de S semble se faire via la production de H₂S sans passer par les sulfites, CysK pouvant alors compenser l'absence de CysM. On peut également noter qu'un certain nombre de molécules dont l'assimilation passe par CysI ne semblent pas impliquer la formation de méthanesulfonate (ex : hypotaurine ou L-homocystéate).

Source de soufre	ADP1	$\Delta msuD$	$\Delta ssuD$	$\Delta cysI$	$\Delta cysM$
L-cystine	+	+	+	+	+
L-cysteine	+	+	+	+	+
Thiosulfate	+	+	+	+	+
Djenkolate	+	+	+	altéré	+
S-methylcysteine	+	+	+	+	+
L-cysteine-S-sulfate	+	+	+	+	+
L-methionine	+	+	altéré	-	-
Methanethiol	+	+	altéré	-	altéré
KMBA	+	+	altéré	-	-
DMSP	+	altéré	altéré	-	altéré
DMSO	+	-	-	-	très altéré
DMSO2	+	-	-	-	très altéré/-
Methanesulfonate	+	+	altéré	-	+
L-methionine sulfone	+	+	altéré	-	très altéré
HMTBA	+	+	altéré	-	très altéré/-
Methional	+	+	retard	-	très altéré/-
MTPA	+	+	très altéré	-	très altéré/-
Hexylsulfate	+	+	+	-	+
Isethionate	+	+	-	-	+
L-CTT	+	+	+	très altéré	très altéré
L-cysteine sulfinic acid	+	+	+	-	+
Nitrocatechol sulfate	+	+	+	très altéré	+
Propanethial	+	+	altéré	-	très altéré
Taurine	+	+	très altéré	-	très altéré
Hypotaurine	+	+	+	-	+
L-cysteate	+	+	altéré	-	retard
L-homocysteate	+	+	+	très altéré	retard
D-homocysteate	retard 30h	-	-	-	-
Cysteamine	?	-	-	-	-
Thioanisole	?	altéré	altéré	-	très altéré
SDS	-	-	-	-	-

Tableau 31 : Liste des sources de soufre testées sur ADP1 et les mutants $\Delta msuD$, $\Delta ssuD$, $\Delta cysI$ et $\Delta cysM$. Les nuances d'orange représentent l'état d'altération de croissance du phénotype étudié.

Néanmoins, pour terminer ce manuscrit, je n'aborderai ci-après que certaines de ces sources de S pour illustrer l'ampleur de ce qu'il reste à découvrir chez ADP1, dont le métabolisme du soufre semble assez différent des autres organismes. Et notamment celles en lien avec le métabolisme non

abordé jusqu'ici lié à la cystéine et à la taurine et ses dérivés, ainsi qu'à l'acide djenkolique dont la métabolisation chez ADP1 ne passe pas par la production de H₂S comme nous allons le voir.

- Taurine, hypotaurine, cystéate

La taurine (2-aminoéthanesulfonate), l'hypotaurine (2-aminoéthanesulfinate) et le cystéate (3-sulfoalanine) sont sources de soufre pour ADP1. Chez certains mammifères, la taurine peut-être synthétisée en une seule étape à partir d'hypotaurine ou de cystéate. Chez *E. coli* K12, le soufre de la taurine est utilisé via l'action d'une dioxygénase dépendante de l' α -cétoglutarate codée par *tauD* (Uniprot ID : P37610), formant du sulfite avec comme co-produits le 2-aminoacétaldéhyde et le succinate. Il n'y a pas d'orthologue de TauD_{K12} chez ADP1. En effet, le meilleur candidat AtsK (ACIAD1592, 39% d'identité) a été montré comme une alkanesulfatase qui n'est pas capable d'utiliser la taurine (Baud et al., 2014)⁴⁴⁴. *Pseudomonas aeruginosa* TAU-5 est capable de croître sur taurine comme source de soufre et Shimamoto & Berk ont montré, après avoir exclu la présence d'une déamination oxydative de la taurine, que la taurine y était transformée par une taurine-pyruvate aminotransférase en sulfoacétaldéhyde⁴⁴⁵. À ce jour et à notre connaissance, seul le gène *tpa* de la bactérie anaérobie sulfidogène *Bilophila wadsworthia* (issue de la flore intestinale humaine) a été identifié comme codant pour une telle enzyme, caractérisée par Laue et Cook³³. Le plus proche homologue chez ADP1 serait l'ACIAD1231 (33 % d'identité), codant pour ArgD (Uniprot ID : Q6FCV3), une acétylornithine aminotransférase. Lors de la campagne de phénotypage de la banque, le gène *argD* s'est révélé essentiel sur L-cystéine mais pas sur taurine, et il s'avère au moins significativement deux fois plus surexprimé sur L-cystéine et sulfate que sur méthionine. Enfin chez *Paracoccus denitrificans*, un cluster de gène (Pden_1640 à Pden_1648) a été identifié comme impliqué dans le catabolisme de la taurine⁴⁴⁶ (figure 145), mais il n'a pas d'orthologue chez ADP1. Les auteurs ont également identifié une hypotaurine-pyruvate aminotransférase (Uniprot ID : A1B9Z3) mais cela n'a pas permis de trouver non plus d'orthologue chez ADP1.

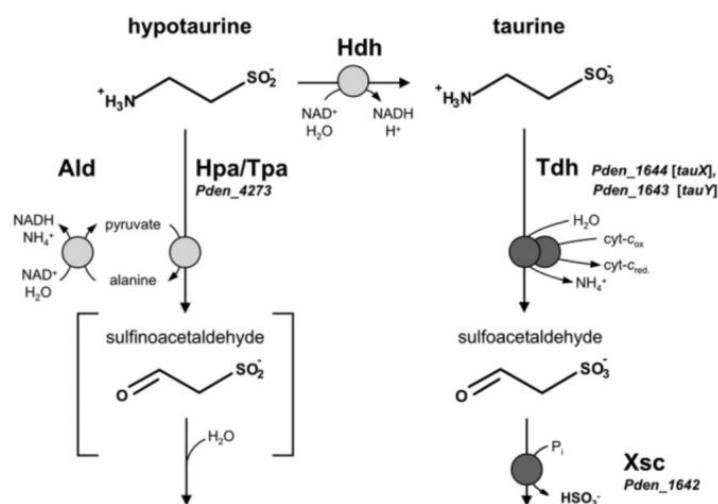


Figure 145 : Catabolisme de l'hypotaurine et de la taurine chez *P. denitrificans* (issu de Felux et al., 2013).

Aucune des enzymes décrites pour le catabolisme de l'hypotaurine ni de la taurine chez *P. denitrificans* n'a donc permis d'identifier d'orthologue chez ADP1. Néanmoins, une chose est sûre chez ADP1 : le catabolisme de ces trois molécules potentiellement liées produit des sulfites, car le mutant $\Delta cysI$ ne croît sur aucun de ces composés (figure 146). Cela concorde également avec l'observation d'une croissance fortement altérée sur les mutants $\Delta ssuDA$ et $\Delta cysM$.

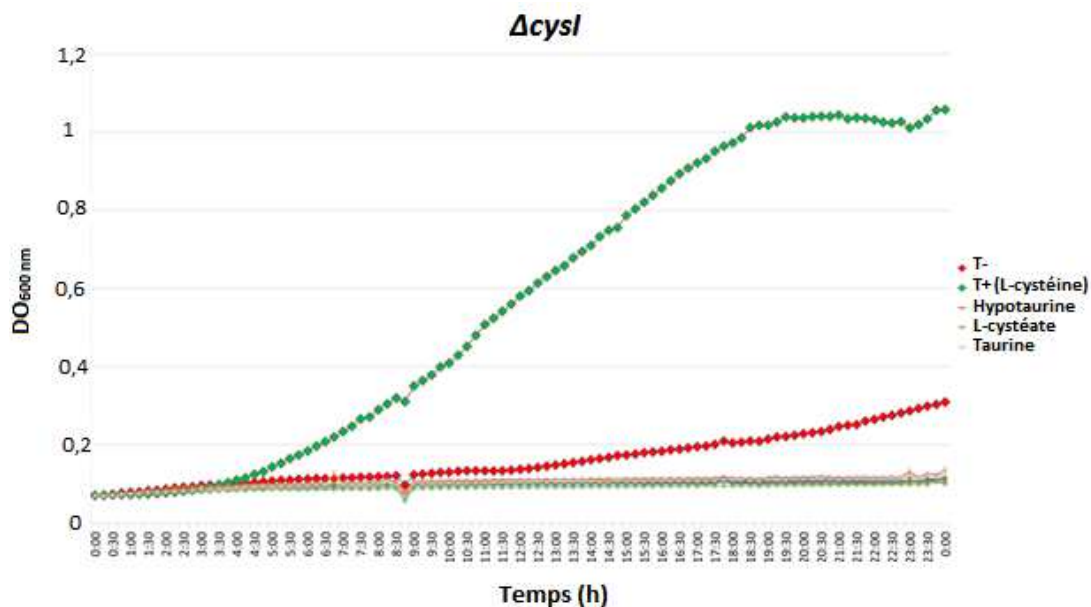


Figure 146 : Courbes de croissance (24h) du mutant $\Delta cysI$ sur taurine et ses dérivés.

- Iséthionate

Felix et al. ont montré que *P. denitrificans* possède un cluster de gènes (Pden_4275 à Pden_4280) impliqués dans le catabolisme de l'iséthionate (2-hydroxyéthanesulfonate)⁴⁴⁶ mais qui n'a pas d'orthologue chez ADP1. Chez *E. coli*, un mutant $\Delta cysI$ a été montré comme accumulant une grande quantité de sulfites tout en étant incapable de pousser sur iséthionate⁴⁴⁷. Nous avons pu montrer que le catabolisme de l'iséthionate produit également du sulfite chez ADP1 car le mutant $\Delta cysI$ est également essentiel. De plus, le gène *ssuD* est essentiel sur iséthionate, suggérant que sa dégradation passe par la voie des alcanesulfonatasés.

- Djenkolate

Pour finir, il a été montré notamment chez *P. putida* que la MGL est capable de réaliser l' α,β -élimination du djenkolate pour former du pyruvate et du NH_4 ⁴⁴⁸. Or chez ADP1, comme nous l'avons déjà évoqué, aucune MGL n'a été identifiée. Il a également été identifié, toujours chez *P. putida*, une S-alkylcystéine α,β -lyase sur lysat cellulaire (Kamitani et al., 1991), dont le produit de la réaction est ensuite spontanément dégradé jusqu'à l' H_2S sans passer par la production de sulfite (figure 147)⁴⁴⁸.

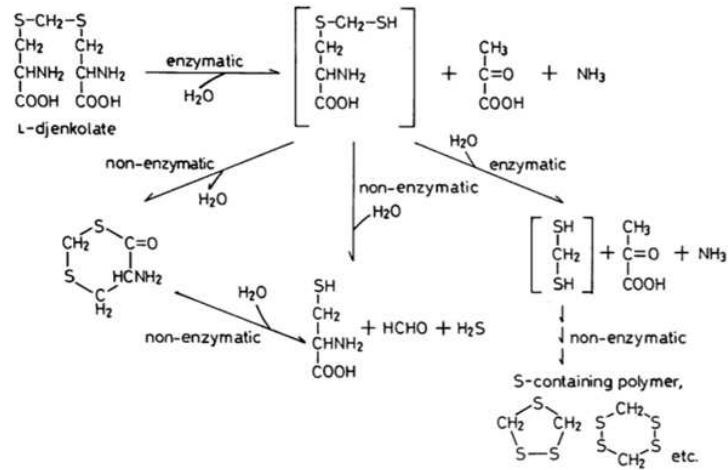


Figure 147 : Dégradation de l'acide djenkolique catalysée par une S-alkylcystéine α,β -lyase (issu de Kamitani et al., 1991)

Chez ADP1, la croissance sur djenkolate sur un mutant ΔcysI n'est que légèrement altérée après une dizaine d'heures (figure 148). Cela pourrait être dû à l'accumulation d'un intermédiaire/co-produit toxique. Il serait néanmoins intéressant lors de la prochaine campagne de phénotypage d'intégrer ce substrat comme source de S.

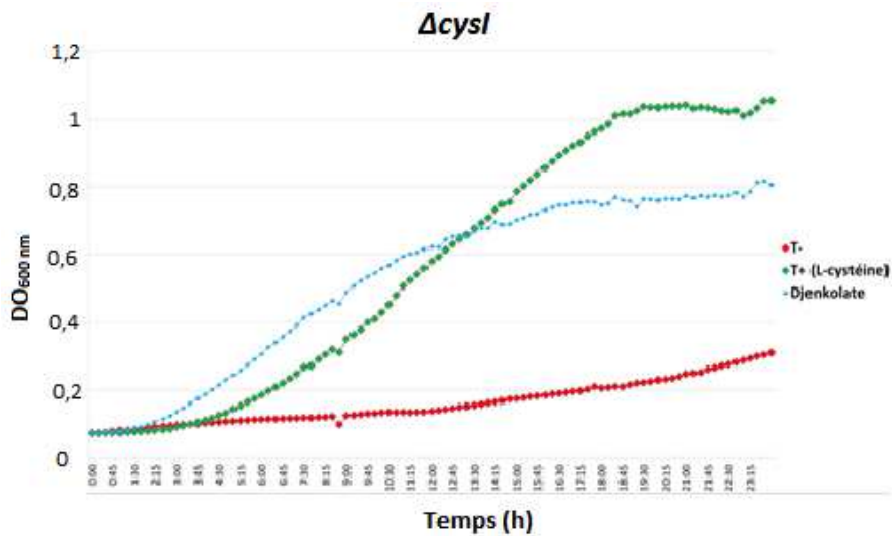


Figure 148 : Croissance (24h) du mutant ΔcysI sur acide djenkolique.

IV Conclusion et perspectives

En cette ère de séquençage de nouvelle génération, permettant en seulement 1 jour de séquencer complètement le génome d'un microbe nouvellement isolé, il existe un réel besoin d'améliorer le système d'annotation pour assurer la fiabilité d'assignation de fonction aux protéines. Généralement, la fonction physiologique d'une famille de protéines est souvent extrapolée à partir de un ou quelques membres caractérisés. Mais les protéines d'une famille peuvent diverger vers des spécialisations différentes, provoquant ainsi des prédictions erronées. Or aujourd'hui, l'annotation fonctionnelle automatique des protéines se fait majoritairement par simple homologie de séquence, ou bien via une combinaison de prédictions bioinformatiques de fonction à partir de protéines caractérisées issues d'organismes soit-disant modèles pourtant non représentatifs de la biodiversité. De plus, de nombreuses protéines sont présentes dans les bases de données sans qu'elles soient reliées aux preuves expérimentales pourtant déjà publiées dans la littérature. De même, le rythme d'annotation manuelle ne suit pas le nombre exponentiellement croissant de génomes publiés. À quelques exceptions comme : les règles d'annotation HAMAP développées par SwissProt ; les bases de données curées manuellement comme BRENDA, ou MetaCyc pour les voies métaboliques ; des bases de données spécifiques de familles comme les enzymes impliquées dans le métabolisme des carbohydrates (base de donnée experte CaZy). Par ailleurs, l'utilisation de méthodes de génomique comparative est très utile pour améliorer les annotations des gènes, mais comme nous l'avons vu tout au long de l'étude du métabolisme du soufre chez ADP1, cette méthode atteint ses limites quand l'organisme d'étude possède un métabolisme original. La difficulté supplémentaire dans ce cas est également d'extraire les données des publications car rien n'oblige les auteurs à identifier clairement les protéines étudiées, sauf dans le cas des structures 3D dont les données sont déposées dans la base de donnée PDB et les identifiants inclus dans les articles correspondant. Cet effort devrait être demandé aux autres communautés car nous avons passé beaucoup de temps à traquer et mener nos enquêtes pour identifier les protéines impliquées dans les différentes voies décrites dans l'introduction de ce manuscrit. L'anonymat de protéines publiées ralentit en plus l'intégration des mises à jour des bases de données et, très fréquemment, nous avons signalé à SwissProt un article caractérisant une des protéines d'Uniprot en réalité mal identifiée dans l'article. C'est pourquoi nous avons tenu, à chaque fois que cela était possible et parce que nous avons utilisé ces identifiants pour rechercher chez ADP1 des homologues, à noter l'identifiant Uniprot pour que ce travail d'enquête puisse être utile pour l'étude du métabolisme du soufre pour d'autres organismes.

Comme nous l'a montré le projet MetX/MetA & SST, l'assignation fonctionnelle automatique des protéines peut engendrer d'importantes erreurs d'annotations pouvant se propager à grande échelle. Une fois dans les bases de données, il est ensuite très difficile de corriger ces erreurs. Au-delà même de la réassignation fonctionnelle des familles de protéines MetA et MetX, via une étude mêlant données expérimentales et modélisations informatiques, l'exemple de la divergence évolutive des MetX souligne le fait que l'utilisation des méthodes de prédiction seules n'aurait probablement pas permis de découvrir les SST, et que l'analyse fine des diversités de sites actifs au sein d'une famille permet de révéler efficacement la diversité de fonctions. Cette méthode, si elle était systématisée, permettrait de créer automatiquement des sous-familles selon les topologies des sites actifs. La création de ces clusters de protéines permettrait ensuite de guider l'expérimentateur pour le choix des protéines à tester et éviter qu'une famille de protéines ne soit étudiée que par le biais de quelques

enzymes partageant le même site actif. En outre, ce cas illustre la relation très complexe qui existe entre évolution d'une séquence protéique et sa fonction biochimique, comme l'a illustré par exemple notre étude sur les enzymes à PLP impliquées dans le métabolisme du soufre. Cette complexité est rendue encore plus difficile avec le fait que des orthologues portent des noms différents selon les organismes, comme Cys2 chez la levure et MetX chez les bactéries pour les L-homosérine acétyltransférases. C'est pourquoi, lors de la publication de l'article sur les familles MetA/MetX, il a été demandé à SwissProt de rebaptiser les enzymes de ces deux familles en fonction des déterminants structuraux qui avaient été identifiés dans cette étude. De même, l'analyse du régulateur Cbl de la réponse concertée des protéines SSI a montré que ce régulateur pouvait également s'appeler SsuR chez les *Burkholderia*, nom déjà utilisé par un troisième organisme pour une autre fonction. De plus, la promiscuité de substrat voire, plus rarement, de réaction des enzymes, donnent un niveau de complexité supplémentaire car une enzyme peut être décrite dans des articles différents pour des activités secondaires et être baptisée selon cette activité parfois décrite qu'*in vitro* comme l'a illustré le travail d'analyse bibliographique sur les enzymes impliquées dans la transsulfuration réverse. Il faut noter que l'outil d'analyse de la bibliographie paperBLAST (<http://papers.genomics.lbl.gov>) nous a été particulièrement utile pour identifier des articles sur des gènes partageant une homologie de séquence avec les protéines candidates d'ADP1 issues de nos analyses. Il est donc difficile d'automatiser l'annotation fonctionnelle des gènes codant pour les protéines sans combiner nécessairement une validation expérimentale des fonctions.

Jusqu'à ce que les bases de données s'améliorent, un utilisateur lambda souhaitant savoir si une voie spécifique se trouve dans un organisme donné devrait ainsi respecter ces trois règles : toujours croiser les informations issues de plusieurs bases de données et pas une seule ; identifier le ou les gènes de signature d'une voie donnée et vérifier leur présence ou absence dans le génome ; et enfin, vérifier systématiquement la littérature récente sur cette voie dans tous les organismes, étant donné que toute nouvelle enzyme de la voie publiée sera sans doute répercutée dans les bases de données, au mieux avec un délai souvent de plus d'un an. Cet important travail qui peut s'assimiler à un travail d'enquête nécessite beaucoup de temps et d'énergie, et c'est ce que je me suis attelé à faire avec le métabolisme du soufre pour tenter d'élucider des voies de recyclage de la méthionine chez ADP1. Malgré l'accès à des ressources génomiques rares pour un organisme d'étude différent des grands modèles bactériens (collection de mutants KO ou ORFéome complet) ainsi que des moyens techniques importants (séquençage de banques de transcriptomes et traitement des données obtenues, analyse LC-MS...), et un important travail expérimental, cette voie de recyclage n'a pas pu être totalement élucidée. Cependant, mon travail a permis de débroussailler largement ce sujet vierge avant mon arrivée, et d'ouvrir de nombreuses voies d'exploration du métabolisme des molécules soufrées en révélant presque une trentaine d'entre elles, sources de soufre chez ADP1. Un schéma général des voies d'assimilation de ces molécules est représenté dans la figure 149. Plusieurs pistes sont déjà suivies au laboratoire pour infirmer ou confirmer les candidats proposés tout au long du manuscrit, ce qui ne manquera pas de nécessiter encore bien d'autres expérimentations.

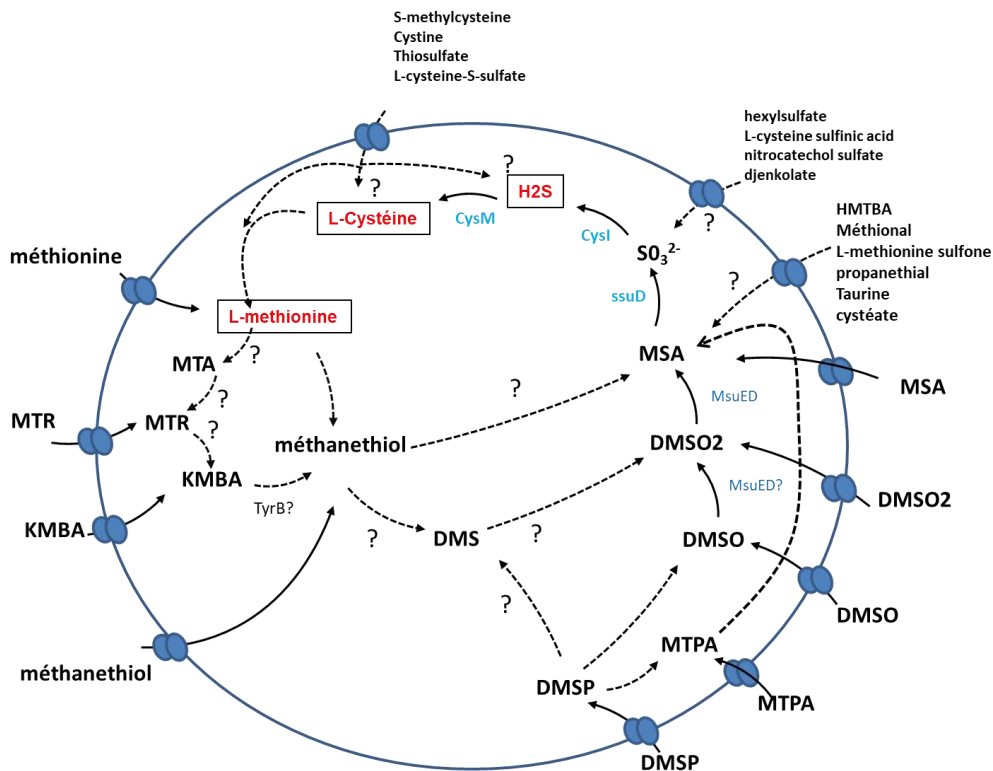


Figure 149 : Voies possibles d'assimilation de molécules sulfurées chez ADP1. Toutes les molécules indiquées sur le schéma sont sources de soufre chez ADP1 (sauf le DMS qui est uniquement suspecté) et ont été placées en fonction des données expérimentales obtenues, avec les mutants des gènes impliqués dans la voie (*cysM*, *cysI*, *ssuD* et *msuED*). Les flèches en pointillés indiquent des réactions/voies inconnues. Les transporteurs ont été schématisés mais la grande majorité est inconnue.

Il faut aussi noter que nous n'avons pas inclus dans mon étude l'identification des transporteurs de ces différentes sources de soufre mais que cette recherche via la collection de mutants devrait être entreprise en commençant par les transporteurs faisant partie des protéines SSI. De même, le laboratoire n'est pas spécialiste des études de régulation et ce sujet fait apparaître qu'un approfondissement de cette question serait nécessaire à l'avenir avec plusieurs questions en suspens, telles que : quel régulateur contrôle Cbl ? Ou encore : quels sont les séquences consensus qui permettent la régulation concertée des protéines SSI chez ADP1 ?

La grande diversité des solutions métaboliques possibles et imaginables dans le métabolisme du soufre n'est pas spécifique à celui-ci. C'est d'ailleurs plus une règle qu'une exception, et cela a été remarqué dès que les premiers génomes entièrement séquencés ont permis de s'éloigner de schémas pré-établis à partir de bactéries modèles comme *E. coli*, alors qu'elles ne sont finalement pas représentatives de la biodiversité mais plutôt un objet d'étude bien adapté aux conditions de laboratoire. Nous l'avons vu par exemple avec la biosynthèse de la cystéine chez les champignons qui, jusqu'à la découverte de cette famille SST majoritairement répandue chez les champignons, était calquée sur celle décrite chez *Saccharomyces cerevisiae* (transsulfuration réverse), finalement une exception. De même, postulé à partir de la caractérisation de MetA chez *E. coli* comme L-homosérine succinyltransférases, il s'avère que la majorité des MetA catalysent plutôt l'acétylation de l'homosérine

comme l'autre bactérie modèle *Bacillus subtilis*, mais cela a été oublié ou ignoré par les bases de données.

La résolution de ce type de voies métaboliques devrait automatiquement être couplée à des analyses phylogénétiques et de génomique comparative ; la biologie intégrative sera sans doute d'une grande aide pour résoudre ce type de problème. Cette nouvelle science, qui concerne la description intégrée des multiples phénomènes intervenant dans les divers niveaux des organisations structurale (ADN, protéine, cellule...) et fonctionnelle (gène, ARNm, enzymes, régulateurs...) hiérarchiques du vivant, n'en est qu'à ses débuts et nécessitera une coopération croissante du chercheur à sa paillasse jusqu'au bioinformaticien effectuant ses recherches *in silico*. Au milieu de ces métadonnées, il y aura toujours une place pour cet humble mais toujours indispensable bourreau de travail qu'est le biochimiste.

Bibliographie

1. Willke, T. Methionine production—a critical review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 9893–9914 (2014).
2. Fremy, G., Masselin, A. & Brasselet, H. Procédé de production de mercaptans par hydrogénolyse enzymatique de disulfures à l'aide d'hydrogène.
3. Fremy, G., Masselin, A. & Brasselet, H. Method for producing l-methionine. (2017).
4. Kredich, N. M. Biosynthesis of Cysteine. *EcoSal Plus* **3**, (2008).
5. Kitabatake, M., So, M. W., Tumbula, D. L. & Söll, D. Cysteine biosynthesis pathway in the archaeon *Methanosarcina barkeri* encoded by acquired bacterial genes? *J. Bacteriol.* **182**, 143–145 (2000).
6. Jost, R. *et al.* Genomic and functional characterization of the *oas* gene family encoding O-acetylserine (thiol) lyases, enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **253**, 237–247 (2000).
7. Nicholson, M. L., Gaasenbeek, M. & Laudenbach, D. E. Two enzymes together capable of cysteine biosynthesis are encoded on a cyanobacterial plasmid. *Mol. Gen. Genet. MGG* **247**, 623–632 (1995).
8. Sato, D. & Nozaki, T. Methionine gamma-lyase: The unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. *IUBMB Life* **61**, 1019–1028 (2009).
9. Sirko, A. E., Zatyka, M. & Hulanicka, M. D. Identification of the *Escherichia coli* *cysM* gene encoding O-acetylserine sulphhydrylase B by cloning with mini-Mu-lac containing a plasmid replicon. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 2719–2725 (1987).
10. Filutowicz, M., Wiater, A. & Hulanicka, D. Delayed inducibility of sulphite reductase in *cysM* mutants of *Salmonella typhimurium* under anaerobic conditions. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1791–1794 (1982).
11. Nakamura, T., Iwahashi, H. & Eguchi, Y. Enzymatic proof for the identity of the S-sulfocysteine synthase and cysteine synthase B of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **158**, 1122–1127 (1984).
12. Iwanicka-Nowicka, R., Zielak, A., Cook, A. M., Thomas, M. S. & Hryniewicz, M. M. Regulation of Sulfur Assimilation Pathways in *Burkholderia cenocepacia*: Identification of Transcription Factors CysB and SsuR and Their Role in Control of Target Genes. *J. Bacteriol.* **189**, 1675–1688 (2007).
13. Burns, K. E. *et al.* Reconstitution of a New Cysteine Biosynthetic Pathway in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 11602–11603 (2005).
14. Ågren, D., Schnell, R., Oehlmann, W., Singh, M. & Schneider, G. Cysteine Synthase (CysM) of *Mycobacterium tuberculosis* Is an O-Phosphoserine Sulphydrylase: EVIDENCE FOR AN ALTERNATIVE CYSTEINE BIOSYNTHESIS PATHWAY IN MYCOBACTERIA. *J. Biol. Chem.* **283**, 31567–31574 (2008).

15. O'Leary, S. E., Jurgenson, C. T., Ealick, S. E. & Begley, T. P. O -Phospho- L -serine and the Thiocarboxylated Sulfur Carrier Protein CysO-COSH Are Substrates for CysM, a Cysteine Synthase from *Mycobacterium tuberculosis* †. *Biochemistry (Mosc.)* **47**, 11606–11615 (2008).
16. Ono, B. I. *et al.* Cysteine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: a new outlook on pathway and regulation. *Yeast Chichester Engl.* **15**, 1365–1375 (1999).
17. Guédon, E. & Martin-Verstraete, I. Cysteine Metabolism and Its Regulation in Bacteria. in *Amino Acid Biosynthesis ~ Pathways, Regulation and Metabolic Engineering* (ed. Wendisch, V. F.) **5**, 195–218 (Springer Berlin Heidelberg, 2007).
18. Kertesz, M. A. Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. *Res. Microbiol.* **152**, 279–290 (2001).
19. Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. F. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**, 3609–3623 (2008).
20. Hidese, R., Mihara, H. & Esaki, N. Bacterial cysteine desulfurases: versatile key players in biosynthetic pathways of sulfur-containing biofactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 47–61 (2011).
21. Iwanicka-Nowicka, R. & Hryniewicz, M. M. A new gene, *cbl*, encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators belongs to *Escherichia coli* *cys* regulon. *Gene* **166**, 11–17 (1995).
22. Ostrowski, J. & Kredich, N. M. Negative autoregulation of *cysB* in *Salmonella typhimurium*: in vitro interactions of CysB protein with the *cysB* promoter. *J. Bacteriol.* **173**, 2212–2218 (1991).
23. Bielińska, A. & Hulanicka, D. Regulation of the *cysB* gene expression in *Escherichia coli*. *Acta Biochim. Pol.* **33**, 133–137 (1986).
24. Kredich, N. M. The molecular basis for positive regulation of *cys* promoters in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**, 2747–2753 (1992).
25. Lochowska, A., Iwanicka-Nowicka, R., Plochocka, D. & Hryniewicz, M. M. Functional Dissection of the LysR-type CysB Transcriptional Regulator: REGIONS IMPORTANT FOR DNA BINDING, INDUCER RESPONSE, OLIGOMERIZATION, AND POSITIVE CONTROL. *J. Biol. Chem.* **276**, 2098–2107 (2001).
26. Cook, P. F. & Wedding, R. T. Cysteine synthetase from *Salmonella typhimurium* LT-2. Aggregation, kinetic behavior, and effect of modifiers. *J. Biol. Chem.* **253**, 7874–7879 (1978).
27. Campanini, B. *et al.* Moonlighting O-acetylserine sulfhydrylase: New functions for an old protein. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1854**, 1184–1193 (2015).
28. Huang, B., Vetting, M. W. & Roderick, S. L. The active site of O-acetylserine sulfhydrylase is the anchor point for bienzyme complex formation with serine acetyltransferase. *J. Bacteriol.* **187**, 3201–3205 (2005).
29. Mino, K. *et al.* Effects of bienzyme complex formation of cysteine synthetase from *Escherichia coli* on some properties and kinetics. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 1628–1640 (2000).

30. Zhao, C. *et al.* On the interaction site of serine acetyltransferase in the cysteine synthase complex from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**, 911–916 (2006).
31. Salsi, E. *et al.* Design of O-acetylserine sulfhydrylase inhibitors by mimicking nature. *J. Med. Chem.* **53**, 345–356 (2010).
32. Zhu, X., Yamaguchi, T. & Masada, M. Complexes of serine acetyltransferase and isozymes of cysteine synthase in spinach leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 947–952 (1998).
33. Tanous, C. *et al.* The CymR Regulator in Complex with the Enzyme CysK Controls Cysteine Metabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **283**, 35551–35560 (2008).
34. Even, S. *et al.* Global Control of Cysteine Metabolism by CymR in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188**, 2184–2197 (2006).
35. Kumar, S., Raj, I., Nagpal, I., Subbarao, N. & Gourinath, S. Structural and Biochemical Studies of Serine Acetyltransferase Reveal Why the Parasite *Entamoeba histolytica* Cannot Form a Cysteine Synthase Complex. *J. Biol. Chem.* **286**, 12533–12541 (2011).
36. Dharavath, S., Raj, I. & Gourinath, S. Structure-based mutational studies of O -acetylserine sulfhydrylase reveal the reason for the loss of cysteine synthase complex formation in *Brucella abortus*. *Biochem. J.* **474**, 1221–1239 (2017).
37. White, R. H. The biosynthesis of cysteine and homocysteine in *Methanococcus jannaschii*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1624**, 46–53 (2003).
38. Helgadóttir, S., Rosas-Sandoval, G., Söll, D. & Graham, D. E. Biosynthesis of phosphoserine in the Methanococcales. *J. Bacteriol.* **189**, 575–582 (2007).
39. Sauerwald, A. *et al.* RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea. *Science* **307**, 1969–1972 (2005).
40. O'Donoghue, P., Sethi, A., Woese, C. R. & Luthey-Schulten, Z. A. The evolutionary history of Cys-tRNA_{Cys} formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 19003–19008 (2005).
41. Sheppard, K. *et al.* From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1813–1825 (2008).
42. Zhang, C.-M., Liu, C., Slater, S. & Hou, Y.-M. Aminoacylation of tRNA with phosphoserine for synthesis of cysteinyl-tRNA(Cys). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 507–514 (2008).
43. Mukai, T. *et al.* RNA-Dependent Cysteine Biosynthesis in Bacteria and Archaea. *mBio* **8**, (2017).
44. Foster, J. *et al.* The *Wolbachia* Genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont Evolution within a Human Pathogenic Nematode. *PLoS Biol.* **3**, e121 (2005).
45. McCutcheon, J. P. & Moran, N. A. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 13–26 (2012).
46. Mapping of the Structural Genes of the Three Aspartokinases and of the Two Homoserine Dehydrogenases of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **117**, 133–143 (1974).

47. Angeles, T. S. & Viola, R. E. The Kinetic Mechanisms of the Bifunctional Enzyme Aspartokinase-Homoserine Dehydrogenase I from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **283**, 96–101 (1990).
48. Graves, L. M. & Switzer, R. L. Aspartokinase III, a new isozyme in *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **172**, 218–223 (1990).
49. Kobashi, N., Nishiyama, M. & Yamane, H. Characterization of Aspartate Kinase III of *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 1391–1394 (2001).
50. Faehnle, C. R., Liu, X., Pavlovsky, A. & Viola, R. E. The initial step in the archaeal aspartate biosynthetic pathway catalyzed by a monofunctional aspartokinase. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **62**, 962–966 (2006).
51. Lee, H.-S. & Hwang, B.-J. Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulfhydrylation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 459–467 (2003).
52. Umbarger, H. E. Amino Acid Biosynthesis and its Regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 533–606 (1978).
53. Cremer, J., Treptow, C., Eggeling, L. & Sahm, H. Regulation of Enzymes of Lysine Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology* **134**, 3221–3229 (1988).
54. Rowbury, R. J. & Woods, D. D. REPRESSION BY METHIONINE OF CYSTATHIONASE FORMATION IN *ESCHERICHIA COLI*. *J. Gen. Microbiol.* **35**, 145–158 (1964).
55. Ferla, M. P. & Patrick, W. M. Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiology* **160**, 1571–1584 (2014).
56. Born, T. L. & Blanchard, J. S. Enzyme-Catalyzed Acylation of Homoserine: Mechanistic Characterization of the *Escherichia coli metA* -Encoded Homoserine Transsuccinylase[†]. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 14416–14423 (1999).
57. Flavin, M. & Slaughter, C. Enzymatic synthesis of homocysteine or methionine directly from O-succinyl-homoserine. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Enzymol.* **132**, 400–405 (1967).
58. Bourhy, P., Martel, A., Margarita, D., Saint Girons, I. & Belfaiza, J. Homoserine O-acetyltransferase, involved in the *Leptospira meyeri* methionine biosynthetic pathway, is not feedback inhibited. *J. Bacteriol.* **179**, 4396–4398 (1997).
59. Yamagata, S. Partial purification and some properties of homoserine O-acetyltransferase of a methionine auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**, 3458–3463 (1987).
60. Kerr, D. S. O-Acetylhomoserine Sulfhydrylase from *Neurospora*. *J. Biol. Chem.* **246**, 95–102 (1971).
61. Gophna, U., Baptiste, E., Doolittle, W. F., Biran, D. & Ron, E. Z. Evolutionary plasticity of methionine biosynthesis. *Gene* **355**, 48–57 (2005).

62. Bastard, K. *et al.* Parallel evolution of non-homologous isofunctional enzymes in methionine biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 858–866 (2017).
63. Goudarzi, M. & Born, T. L. Purification and characterization of *Thermotoga maritima* homoserine transsuccinylase indicates it is a transacetylase. *Extremophiles* **10**, 469–478 (2006).
64. Ziegler, K., Yusupov, M., Bishop, B. & Born, T. L. Substrate analysis of homoserine acyltransferase from *Bacillus cereus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 510–515 (2007).
65. Rotem, O., Biran, D. & Ron, E. Z. Methionine biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens*: study of the first enzyme. *Res. Microbiol.* **164**, 12–16 (2013).
66. Brush, A. & Paulus, H. The enzymic formation of O-acetylhomoserine in *Bacillus subtilis* and its regulation by methionine and S-adenosylmethionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 735–741 (1971).
67. Wyman, A. & Paulus, H. Purification and properties of homoserine transacetylase from *Bacillus polymyxa*. *J. Biol. Chem.* **250**, 3897–3903 (1975).
68. Hwang, B.-J., Park, S.-D., Kim, Y., Kim, P. & Lee, H.-S. Biochemical analysis on the parallel pathways of methionine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1010–1017 (2007).
69. Hacham, Y. In Vivo Analysis of Various Substrates Utilized by Cystathionine -Synthase and O-Acetylhomoserine Sulfhydrylase in Methionine Biosynthesis. *Mol. Biol. Evol.* **20**, 1513–1520 (2003).
70. Foglino, M., Borne, F., Bally, M., Ball, G. & Patte, J. C. A direct sulfhydrylation pathway is used for methionine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **141**, 431–439 (1995).
71. Andersen, G. L., Beattie, G. A. & Lindow, S. E. Molecular characterization and sequence of a methionine biosynthetic locus from *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.* **180**, 4497–4507 (1998).
72. Alaminos, M. & Ramos, J. The methionine biosynthetic pathway from homoserine in *Pseudomonas putida* involves the metW, metX, metZ, methH and metE gene products. *Arch. Microbiol.* **176**, 151–154 (2001).
73. de Berardinis, V. *et al.* A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol. Syst. Biol.* **4**, (2008).
74. Zubieta, C., Arkus, K. A. J., Cahoon, R. E. & Jez, J. M. A Single Amino Acid Change Is Responsible for Evolution of Acyltransferase Specificity in Bacterial Methionine Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 7561–7567 (2008).
75. Omelchenko, M. V., Galperin, M. Y., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. Non-homologous isofunctional enzymes: a systematic analysis of alternative solutions in enzyme evolution. *Biol. Direct* **5**, 31 (2010).
76. de Melo-Minardi, R. C., Bastard, K. & Artiguenave, F. Identification of subfamily-specific sites based on active sites modeling and clustering. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **26**, 3075–3082 (2010).
77. Bott, M. *Amino acid fermentation*. (Springer, 2017).

78. Wyman, A., Shelton, E. & Paulus, H. Regulation of homoserine transacetylase in whole cells of *Bacillus polymyxa*. *J. Biol. Chem.* **250**, 3904–3908 (1975).
79. Ron, E. Z. & Shani, M. Growth rate of *Escherichia coli* at elevated temperatures: reversible inhibition of homoserine trans-succinylase. *J. Bacteriol.* **107**, 397–400 (1971).
80. Ron, E. Z. Growth rate of Enterobacteriaceae at elevated temperatures: limitation by methionine. *J. Bacteriol.* **124**, 243–246 (1975).
81. Chassagnole, C., Raïs, B., Quentin, E., Fell, D. A. & Mazat, J. P. An integrated study of threonine-pathway enzyme kinetics in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **356**, 415–423 (2001).
82. Bartlem, D. *et al.* Mutation in the threonine synthase gene results in an over-accumulation of soluble methionine in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **123**, 101–110 (2000).
83. Ivanova, N. *et al.* Complete genome sequence of *Haliangium ochraceum* type strain (SMP-2). *Stand. Genomic Sci.* **2**, 96–106 (2010).
84. Ravanel, S., Gakière, B., Job, D. & Douce, R. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 7805–7812 (1998).
85. Holbrook, E. L., Greene, R. C. & Krueger, J. H. Purification and properties of cystathionine gamma-synthase from overproducing strains of *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc.)* **29**, 435–442 (1990).
86. Auger, S., Yuen, W. H., Danchin, A. & Martin-Verstraete, I. The metIC operon involved in methionine biosynthesis in *Bacillus subtilis* is controlled by transcription antitermination. *Microbiology* **148**, 507–518 (2002).
87. Catazaro, J., Caprez, A., Guru, A., Swanson, D. & Powers, R. Functional evolution of PLP-dependent enzymes based on active-site structural similarities: Functional Evolution of PLP-Dependent Enzymes. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **82**, 2597–2608 (2014).
88. Matthews, R. G. & Hondorp, E. R. Methionine. *EcoSal Plus* **2**, (2006).
89. Kanzaki, H., Kobayashi, M., Nagasawa, T. & Yamada, H. Distribution of two kinds of cystathionine γ -synthase in various bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **33**, 65–68 (1986).
90. Kaplan, M. M. & Flavin, M. Cystathionine γ -Synthetase of *Salmonella*. *J. Biol. Chem.* **241**, 4463–4471 (1966).
91. Guggenheim, S. & Flavin, M. Cystathionine gamma-synthase from *Salmonella*. Beta elimination and replacement reactions and inhibition by O-succinylserine. *J. Biol. Chem.* **244**, 3722–3727 (1969).
92. Kong, Y. *et al.* Enzymatic Characterization and Inhibitor Discovery of a New Cystathionine - Synthase from *Helicobacter pylori*. *J. Biochem. (Tokyo)* **143**, 59–68 (2007).
93. Saha, B., Mukherjee, S. & Das, A. K. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* cystathionine gamma synthase—Apo- and holoforms. *Int. J. Biol. Macromol.* **44**, 385–392 (2009).

94. Hunter, S. *et al.* InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res.* **40**, D306-312 (2012).
95. Hwang, B.-J., Yeom, H.-J., Kim, Y. & Lee, H.-S. *Corynebacterium glutamicum* Utilizes both Transsulfuration and Direct Sulfhydrylation Pathways for Methionine Biosynthesis. *J. Bacteriol.* **184**, 1277–1286 (2002).
96. Kanzaki, H., Nagasawa, T. & Yamada, H. Highly efficient production of L-cystathionine from O-succinyl-L-homoserine and L-cysteine by *Streptomyces cystathionine* γ -lyase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 97–100 (1986).
97. Kanzaki, H., Kobayashi, M., Nagasawa, T. & Yamada, H. Purification and characterization of cystathionine gamma-synthase type II from *Bacillus sphaericus*. *Eur. J. Biochem.* **163**, 105–112 (1987).
98. Shimizu, H. *et al.* Cloning and overexpression of the *oah1* gene encoding O-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase of *Thermus thermophilus* HB8 and characterization of the gene product. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1549**, 61–72 (2001).
99. Iwama, T. *et al.* Comparative Characterization of the *oah2* Gene Homologous to the *oah1* of *Thermus thermophilus* HB8. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 1357–1361 (2004).
100. Balish, E. & Shapiro, S. K. Balish-1966 (CBL E coli et *Aerobacter aerogenes*).pdf. *J. Bacteriol.* **92**, 1331–1336 (1966).
101. Wijesundera, S. & Woods, D. D. The catabolism of cystathionine by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **29**, 353–366 (1962).
102. Dwivedi, C. M., Ragin, R. C. & Uren, J. R. Cloning, purification, and characterization of beta-cystathionase from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc.)* **21**, 3064–3069 (1982).
103. Flint, D. H., Tuminello, J. F. & Miller, T. J. Studies on the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* crude extract isolation of O-acetylserine sulfhydrylases A and B and β -cystathionase based on their ability to mobilize sulfur from cysteine and to participate in Fe-S cluster synthesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 16053–16067 (1996).
104. Awano, N. *et al.* Effect of cysteine desulfhydrase gene disruption on L-cysteine overproduction in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 239–243 (2003).
105. Arai, R. *et al.* Conserved protein TTHA1554 from *Thermus thermophilus* HB8 binds to glutamine synthetase and cystathionine β -lyase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1750**, 40–47 (2005).
106. Rossol, I. & Pühler, A. The *Corynebacterium glutamicum* *aecD* Gene Encodes a C-S Lyase with α,β -Elimination Activity That Degrades Aminoethylcysteine. *J. Bacteriol.* **174**, 2968–2977 (1992).
107. Rückert, C., Pühler, A. & Kalinowski, J. Genome-wide analysis of the L-methionine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* by targeted gene deletion and homologous complementation. *J. Biotechnol.* **104**, 213–228 (2003).

108. Troccaz, M., Benattia, F., Borchard, G. & Clark, A. J. Properties of Recombinant *Staphylococcus haemolyticus* Cystathionine β -Lyase (*metC*) and Its Potential Role in the Generation of Volatile Thiols in Axillary Malodor. *Chem. Biodivers.* **5**, 2372–2385 (2008).
109. Hullo, M.-F. *et al.* Conversion of Methionine to Cysteine in *Bacillus subtilis* and Its Regulation. *J. Bacteriol.* **189**, 187–197 (2007).
110. Clausen, T., Huber, R., Laber, B., Pohlenz, H.-D. & Messerschmidt, A. Crystal Structure of the Pyridoxal-5'-phosphate Dependent Cystathionine β -lyase from *Escherichia coli* at 1.83 Å. *J. Mol. Biol.* **262**, 202–224 (1996).
111. Reidl, J. & Boos, W. The *malX malY* operon of *Escherichia coli* encodes a novel enzyme II of the phosphotransferase system recognizing glucose and maltose and an enzyme abolishing the endogenous induction of the maltose system. *J. Bacteriol.* **173**, 4862–4876 (1991).
112. ZDYCH, E., PEIST, R., REIDL, J. & BOOS, W. MalY of *Escherichia coli* Is an Enzyme with the Activity of a C-S Lyase (Cystathionase). *J BACTERIOL* **177**, 5 (1995).
113. Clausen, T. *et al.* X-ray structure of MalY from *Escherichia coli*: a pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzyme acting as a modulator in *mal* gene expression. *EMBO J.* **19**, 831–842 (2000).
114. Awano, N., Wada, M., Mori, H., Nakamori, S. & Takagi, H. Identification and Functional Analysis of *Escherichia coli* Cysteine Desulphhydrases. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4149–4152 (2005).
115. Auger, S., Gomez, M. P., Danchin, A. & Martin-Verstraete, I. The PatB protein of *Bacillus subtilis* is a C-S-lyase. *Biochimie* **87**, 231–238 (2005).
116. Irmeler, S., SchÄrfer, H., Beisert, B., Rauhut, D. & Berthoud, H. Identification and characterization of a strain-dependent cystathionine β -lyase in *Lactobacillus casei* potentially involved in cysteine biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **295**, 67–76 (2009).
117. Knoll, C., du Toit, M., Schnell, S., Rauhut, D. & Irmeler, S. Cloning and characterisation of a cystathionine β / γ -lyase from two *Oenococcus oeni* oenological strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1051–1060 (2011).
118. Aubel, D., Germond, J. E., Gilbert, C. & Atlan, D. Isolation of the *patC* gene encoding the cystathionine beta-lyase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and molecular analysis of inter-strain variability in enzyme biosynthesis. *Microbiol. Read. Engl.* **148**, 2029–2036 (2002).
119. Soo, V. W. C., Yosaatmadja, Y., Squire, C. J. & Patrick, W. M. Mechanistic and Evolutionary Insights from the Reciprocal Promiscuity of Two Pyridoxal Phosphate-dependent Enzymes. *J. Biol. Chem.* **291**, 19873–19887 (2016).
120. Ferla, M. P., Brewster, J. L., Hall, K. R., Evans, G. B. & Patrick, W. M. Primordial-like enzymes from bacteria with reduced genomes. *Mol. Microbiol.* **105**, 508–524 (2017).
121. Kato, S. & Oikawa, T. A Novel Bifunctional Amino Acid Racemase With Multiple Substrate Specificity, MalY From *Lactobacillus sakei* LT-13: Genome-Based Identification and Enzymological Characterization. *Front. Microbiol.* **9**, 403 (2018).

122. Patrick, W. M., Quandt, E. M., Swartzlander, D. B. & Matsumura, I. Multicopy suppression underpins metabolic evolvability. *Mol. Biol. Evol.* **24**, 2716–2722 (2007).
123. Yamagata, S. *et al.* Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* MET17/MET25 gene in *Escherichia coli* and comparative characterization of the product with O-acetylserine-O-acetylhomoserine sulfhydrylase of the yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 92–99 (1994).
124. Ozaki, H. & Shiio, I. Methionine biosynthesis in *Brevibacterium flavum*: properties and essential role of O-acetylhomoserine sulfhydrylase. *J. Biochem. (Tokyo)* **91**, 1163–1171 (1982).
125. Belfaiza, J., Martel, A., Margarita, D. & Saint Girons, I. Direct sulfhydrylation for methionine biosynthesis in *Leptospira meyeri*. *J. Bacteriol.* **180**, 250–255 (1998).
126. Krishnamoorthy, K. & Begley, T. P. Protein Thiocarboxylate-Dependent Methionine Biosynthesis in *Wolinella succinogenes*. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 379–386 (2011).
127. Aitken, S. M. & Kirsch, J. F. The enzymology of cystathionine biosynthesis: strategies for the control of substrate and reaction specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* **433**, 166–175 (2005).
128. Bairoch, A. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res.* **28**, 304–305 (1999).
129. Erb, T. J. *et al.* A RubisCO-like protein links SAM metabolism with isoprenoid biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 926–932 (2012).
130. Bolten, C. J. Towards methionine overproduction in *Corynebacterium glutamicum* - methanethiol and dimethyldisulfide as reduced sulfur sources. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 1196–1203 (2010).
131. Krömer, J. O., Wittmann, C., Schröder, H. & Heinzle, E. Metabolic pathway analysis for rational design of L-methionine production by *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum*. *Metab. Eng.* **8**, 353–369 (2006).
132. Omura, H. *et al.* Purification, characterization and gene cloning of thermostable O-acetyl-homoserine sulfhydrylase forming γ -cyano- α -aminobutyric acid. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 53–58 (2003).
133. Picardeau, M., Bauby, H. & Saint Girons, I. Genetic evidence for the existence of two pathways for the biosynthesis of methionine in the *Leptospira* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* **225**, 257–262 (2003).
134. Qin, X. & Martin, S. A. Cloning of the O -Acetylhomoserine Sulfhydrylase Gene from the Ruminant Bacterium *Selenomonas ruminantium* HD4. *Curr. Microbiol.* **48**, 305–311 (2004).
135. Taté, R., Riccio, A., Caputo, E., Iaccarino, M. & Patriarca, E. J. The *Rhizobium etli* metZ gene is essential for methionine biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **12**, 24–34 (1999).
136. Morinaga, Y., Tani, Y. & Yamada, H. Biosynthesis of Homocysteine in a Facultative Methylotroph, *Pseudomonas* FM518. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2855–2860 (1983).
137. Vermeij, P. & Kertesz, M. A. Pathways of Assimilative Sulfur Metabolism in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **181**, 5833–5837 (1999).

138. Palleroni, N. J. Family I. Pseudomonadaceae. in *Bergey's manual of systematic bacteriology* **1**, 141–213 (1988).
139. Liu, Y., Sieprawska-Lupa, M., Whitman, W. B. & White, R. H. Cysteine Is Not the Sulfur Source for Iron-Sulfur Cluster and Methionine Biosynthesis in the Methanogenic Archaeon *Methanococcus maripaludis*. *J. Biol. Chem.* **285**, 31923–31929 (2010).
140. Rauch, B. J., Gustafson, A. & Perona, J. J. Novel proteins for homocysteine biosynthesis in anaerobic microorganisms. *Mol. Microbiol.* **94**, 1330–1342 (2014).
141. Allen, K. D., Miller, D. V., Rauch, B. J., Perona, J. J. & White, R. H. Homocysteine Is Biosynthesized from Aspartate Semialdehyde and Hydrogen Sulfide in Methanogenic Archaea. *Biochemistry (Mosc.)* **54**, 3129–3132 (2015).
142. Lucas, M. *et al.* Binding of S-methyl-5'-thioadenosine and S-adenosyl-L-methionine to protein MJ0100 triggers an open-to-closed conformational change in its CBS motif pair. *J. Mol. Biol.* **396**, 800–820 (2010).
143. Seiflein, T. A. & Lawrence, J. G. Two Transsulfurylation Pathways in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **188**, 5762–5774 (2006).
144. Percudani, R. & Peracchi, A. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics* **10**, 273 (2009).
145. Percudani, R. & Peracchi, A. A genomic overview of pyridoxal-phosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep.* **4**, 850–854 (2003).
146. Schneider, G., Käck, H. & Lindqvist, Y. The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. *Struct. Lond. Engl.* **1993** **8**, R1-6 (2000).
147. Grishin, N. V., Phillips, M. A. & Goldsmith, E. J. Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **4**, 1291–1304 (1995).
148. Mehta, P. K. & Christen, P. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **74**, 129–184 (2000).
149. Christen, P. & Mehta, P. K. From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Chem. Rec. N. Y. N* **1**, 436–447 (2001).
150. Dunathan, H. C. Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **55**, 712–716 (1966).
151. Eliot, A. C. & Kirsch, J. F. Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 383–415 (2004).
152. Toney, M. D. Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1814**, 1407–1418 (2011).

153. Aitken, S. M. & Kirsch, J. F. Kinetics of the Yeast Cystathionine β -Synthase Forward and Reverse Reactions: Continuous Assays and the Equilibrium Constant for the Reaction [†]. *Biochemistry (Mosc.)* **42**, 571–578 (2003).
154. Brzovic, P., Holbrook, E. L., Greene, R. C. & Dunn, M. F. Reaction mechanism of Escherichia coli cystathionine γ -synthase: direct evidence for a pyridoxamine derivative of vinylglyoxylate as a key intermediate in pyridoxal phosphate dependent γ -elimination and γ -replacement reactions. *Biochemistry (Mosc.)* **29**, 442–451 (1990).
155. Clausen, T., Huber, R., Prade, L., Wahl, M. C. & Messerschmidt, A. Crystal structure of Escherichia coli cystathionine γ -synthase at 1.5 Å resolution. *EMBO J.* **17**, 6827–6838 (1998).
156. Messerschmidt, A. *et al.* Determinants of enzymatic specificity in the Cys-Met-metabolism PLP-dependent enzymes family: crystal structure of cystathionine γ -lyase from yeast and intrafamilial structure comparison. *Biol. Chem.* **384**, 373–386 (2003).
157. Aitken, S. M., Lodha, P. H. & Morneau, D. J. K. The enzymes of the transsulfuration pathways: Active-site characterizations. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1814**, 1511–1517 (2011).
158. Hopwood, E. M. S., Ahmed, D. & Aitken, S. M. A role for glutamate-333 of Saccharomyces cerevisiae cystathionine γ -lyase as a determinant of specificity. *Biochim. Biophys. Acta* **1844**, 465–472 (2014).
159. Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., Birney, E., Bateman, A. & Durbin, R. Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. *Nucleic Acids Res.* **26**, 320–322 (1998).
160. Punta, M. *et al.* The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **40**, D290–D301 (2012).
161. Alexander, F. W., Sandmeier, E., Mehta, P. K. & Christen, P. Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific α , β and γ families. *Eur. J. Biochem.* **219**, 953–960 (1994).
162. Farsi, A. *et al.* Interconversion of a pair of active-site residues in Escherichia coli cystathionine γ -synthase, E. coli cystathionine β -lyase, and Saccharomyces cerevisiae cystathionine γ -lyase and development of tools for the investigation of their mechanisms and reaction specificity. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **87**, 445–457 (2009).
163. Manders, A. L., Jaworski, A. F., Ahmed, M. & Aitken, S. M. Exploration of structure–function relationships in Escherichia coli cystathionine γ -synthase and cystathionine β -lyase via chimeric constructs and site-specific substitutions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1834**, 1044–1053 (2013).
164. Frasca, V., Banerjee, R. V., Dunham, W. R., Sands, R. H. & Matthews, R. G. Cobalamin-dependent methionine synthase from Escherichia coli B: electron paramagnetic resonance spectra of the inactive form and the active methylated form of the enzyme. *Biochemistry (Mosc.)* **27**, 8458–8465 (1988).

165. González, J. C., Banerjee, R. V., Huang, S., Sumner, J. S. & Matthews, R. G. Comparison of cobalamin-independent and cobalamin-dependent methionine synthases from *Escherichia coli*: two solutions to the same chemical problem. *Biochemistry (Mosc.)* **31**, 6045–6056 (1992).
166. Rodionov, D. A. Comparative genomics of the methionine metabolism in Gram-positive bacteria: a variety of regulatory systems. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3340–3353 (2004).
167. Thangavelu, B. & Viola, R. Alternative Microbial Routes to Homoserine Activation and Sulfuration: Critical Steps in Methionine Biosynthesis. *Int. J. Biochem. Res. Rev.* **11**, 1–22 (2016).
168. Urbanowski, M. L., Stauffer, L. T., Plamann, L. S. & Stauffer, G. V. A new methionine locus, *metR*, that encodes a trans-acting protein required for activation of *metE* and *metH* in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **169**, 1391–1397 (1987).
169. Hwang, B. J. *et al.* Analysis of *Corynebacterium glutamicum* methionine biosynthetic pathway: isolation and analysis of *metB* encoding cystathionine gamma-synthase. *Mol. Cells* **9**, 300–308 (1999).
170. Kaze, H. & Nakayama, K. Production of O-Acetyl-L-Homoserine by Methionine Analog-resistant Mutants and Regulation of Homoserine-O-transacetylase in *Corynebacterium glutamicum*. **38**, 2021–2030
171. Born, T. L., Franklin, M. & Blanchard, J. S. Enzyme-Catalyzed Acylation of Homoserine: Mechanistic Characterization of the *Haemophilus influenzae met2* -Encoded Homoserine Transacetylase[†]. *Biochemistry (Mosc.)* **39**, 8556–8564 (2000).
172. Tanioka, Y. *et al.* Occurrence of pseudovitamin B12 and its possible function as the cofactor of cobalamin-dependent methionine synthase in a cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **55**, 518–521 (2009).
173. Tanioka, Y. *et al.* Methyladeninylcobamide functions as the cofactor of methionine synthase in a Cyanobacterium, *Spirulina platensis* NIES-39. *FEBS Lett.* **584**, 3223–3226 (2010).
174. Serra, A. L. *et al.* Glycine betaine transmethylase mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **184**, 4301–4303 (2002).
175. Barra, L. *et al.* Interrelations between glycine betaine catabolism and methionine biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* strain 102F34. *J. Bacteriol.* **188**, 7195–7204 (2006).
176. Sun, J. *et al.* One carbon metabolism in SAR11 pelagic marine bacteria. *PloS One* **6**, e23973 (2011).
177. Mukkada, A. J. & Simon, M. W. *Leishmania tropica*: Uptake of methionine by promastigotes. *Exp. Parasitol.* **42**, 87–96 (1977).
178. Sofia, H. J., Chen, G., Hetzler, B. G., Reyes-Spindola, J. F. & Miller, N. E. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1097–1106 (2001).

179. Markham, G. D., Hafner, E. W., Tabor, C. W. & Tabor, H. S-Adenosylmethionine synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**, 9082–9092 (1980).
180. Satishchandran, C., Taylor, J. C. & Markham, G. D. Isozymes of S-adenosylmethionine synthetase are encoded by tandemly duplicated genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **9**, 835–846 (1993).
181. Wei, Y. & Newman, E. B. Studies on the role of the metK gene product of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **43**, 1651–1656 (2002).
182. Markham, G. D. & Satishchandran, C. Identification of the reactive sulfhydryl groups of S-adenosylmethionine synthetase. *J. Biol. Chem.* **263**, 8666–8670 (1988).
183. Reczkowski, R. S. & Markham, G. D. Structural and functional roles of cysteine 90 and cysteine 240 in S-adenosylmethionine synthetase. *J. Biol. Chem.* **270**, 18484–18490 (1995).
184. Su, C. H. & Greene, R. C. Regulation of methionine biosynthesis in *Escherichia coli*: mapping of the metJ locus and properties of a metJ plus-metJ minus diploid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 367–371 (1971).
185. Ren, D., Bedzyk, L. A., Thomas, S. M., Ye, R. W. & Wood, T. K. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 515–524 (2004).
186. Komoto, J., Yamada, T., Takata, Y., Markham, G. D. & Takusagawa, F. Crystal structure of the S-adenosylmethionine synthetase ternary complex: a novel catalytic mechanism of S-adenosylmethionine synthesis from ATP and Met. *Biochemistry (Mosc.)* **43**, 1821–1831 (2004).
187. Kamarthapu, V., Rao, K. V., Srinivas, P. N. B. S., Reddy, G. B. & Reddy, V. D. Structural and kinetic properties of *Bacillus subtilis* S-adenosylmethionine synthetase expressed in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 1949–1958 (2008).
188. Wang, S., Arends, S. J. R., Weiss, D. S. & Newman, E. B. A deficiency in S-adenosylmethionine synthetase interrupts assembly of the septal ring in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **58**, 791–799 (2005).
189. Lin, Y.-F. *et al.* Comparative immunoproteomics of identification and characterization of virulence factors from *Helicobacter pylori* related to gastric cancer. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **5**, 1484–1496 (2006).
190. Hoffman, N. E., Liu, Y. & Yang, S. F. Changes in 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid content in wilted wheat leaves in relation to their ethylene production rates and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content. *Planta* **157**, 518–523 (1983).
191. Bleecker, A. B. & Kende, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 1–18 (2000).
192. Sauter, M., Moffatt, B., Saechao, M. C., Hell, R. & Wirtz, M. Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *Biochem. J.* **451**, 145–154 (2013).

193. Xu, D. *et al.* Different activated methyl cycle pathways affect the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* **211**, 160–168 (2017).
194. Fontecave, M., Atta, M. & Mulliez, E. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 243–249 (2004).
195. Rezzonico, F. & Duffy, B. Lack of genomic evidence of AI-2 receptors suggests a non-quorum sensing role for luxS in most bacteria. *BMC Microbiol.* **8**, 154 (2008).
196. Whiteley, M., Diggle, S. P. & Greenberg, E. P. Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* **551**, 313–320 (2017).
197. Reddy, M. C. M. *et al.* Crystal structures of *Mycobacterium tuberculosis* S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in ternary complex with substrate and inhibitors. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **17**, 2134–2144 (2008).
198. Redanz, S., Standar, K., Podbielski, A. & Kreikemeyer, B. Heterologous Expression of *sahH* Reveals That Biofilm Formation Is Autoinducer-2-independent in *Streptococcus sanguinis* but Is Associated with an Intact Activated Methionine Cycle. *J. Biol. Chem.* **287**, 36111–36122 (2012).
199. Yoch, D. C. Dimethylsulfoniopropionate: its sources, role in the marine food web, and biological degradation to dimethylsulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5804–5815 (2002).
200. Gevrekci, A. Ö. The roles of polyamines in microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 204 (2017).
201. Abraham, K. A. Studies on DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*. 1. The mechanism of polyamine induced stimulation of enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* **5**, 143–146 (1968).
202. Frydman, L. *et al.* Interactions between natural polyamines and tRNA: an 15N NMR analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 9186–9190 (1992).
203. Huang, S. C., Panagiotidis, C. A. & Canellakis, E. S. Transcriptional effects of polyamines on ribosomal proteins and on polyamine-synthesizing enzymes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 3464–3468 (1990).
204. Tabor, C. W. & Tabor, H. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* **49**, 81–99 (1985).
205. Stevens, L. & Morrison, M. R. Studies on the role of polyamines associated with the ribosomes from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. J.* **108**, 633–640 (1968).
206. Weaver, R. H. & Herbst, E. J. Metabolism of diamines and polyamines in microorganisms. *J. Biol. Chem.* **231**, 637–646 (1958).
207. Ohnuma, M. *et al.* N1-aminopropylagmatine, a new polyamine produced as a key intermediate in polyamine biosynthesis of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* **280**, 30073–30082 (2005).
208. Morimoto, N. *et al.* Dual biosynthesis pathway for longer-chain polyamines in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *J. Bacteriol.* **192**, 4991–5001 (2010).

209. Oshima, T. Enigmas of biosyntheses of unusual polyamines in an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Plant Physiol. Biochem. PPB* **48**, 521–526 (2010).
210. Hamana, K. & Matsuzaki, S. Polyamines as a chemotaxonomic marker in bacterial systematics. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 261–283 (1992).
211. Hosoya, R., Hamana, K., Niitsu, M. & Itoh, T. Polyamine analysis for chemotaxonomy of thermophilic eubacteria: Polyamine distribution profiles within the orders Aquificales, Thermotogales, Thermodesulfobacteriales, Thermales, Thermoanaerobacteriales, Clostridiales and Bacillales. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **50**, 271–287 (2004).
212. Oshima, T., Moriya, T. & Terui, Y. Identification, chemical synthesis, and biological functions of unusual polyamines produced by extreme thermophiles. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **720**, 81–111 (2011).
213. Winans, S. C. & Bassler, B. L. Mob Psychology. *J. Bacteriol.* **184**, 873–883 (2002).
214. Albers, E. Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. *IUBMB Life* **61**, 1132–1142 (2009).
215. North, J. A., Miller, A. R., Wildenthal, J. A., Young, S. J. & Tabita, F. R. Microbial pathway for anaerobic 5'-methylthioadenosine metabolism coupled to ethylene formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E10455–E10464 (2017).
216. Sekowska, A. & Danchin, A. The methionine salvage pathway in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiol.* **2**, 8 (2002).
217. Schroeder, H. R., Barnes, C. J., Bohinski, R. C. & Mallette, M. F. Biological production of 5-methylthioribose. *Can. J. Microbiol.* **19**, 1347–1354 (1973).
218. Sekowska, A., Kung, H. F. & Danchin, A. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 145–177 (2000).
219. Sekowska, A. *et al.* Bacterial variations on the methionine salvage pathway. *BMC Microbiol.* **4**, 9 (2004).
220. Sekowska, A. & Danchin, A. Identification of *yrpU* as the methylthioadenosine nucleosidase gene in *Bacillus subtilis*. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* **6**, 255–264 (1999).
221. Cornell, K. A., Winter, R. W., Tower, P. A. & Riscoe, M. K. Affinity purification of 5-methylthioribose kinase and 5-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase from *Klebsiella pneumoniae* [corrected]. *Biochem. J.* **317** (Pt 1), 285–290 (1996).
222. Sun, J., Daniel, R., Wagner-Döbler, I. & Zeng, A.-P. Is autoinducer-2 a universal signal for interspecies communication: a comparative genomic and phylogenetic analysis of the synthesis and signal transduction pathways. *BMC Evol. Biol.* **4**, 36 (2004).
223. Riscoe, M. K., Ferro, A. J. & Fitchen, J. H. Analogs of 5-methylthioribose, a novel class of antiprotozoal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1904–1906 (1988).

224. Guan, R., Ho, M.-C., Almo, S. C. & Schramm, V. L. Methylthioinosine phosphorylase from *Pseudomonas aeruginosa*. Structure and annotation of a novel enzyme in quorum sensing. *Biochemistry (Mosc.)* **50**, 1247–1254 (2011).
225. Miller, D., O'Brien, K., Xu, H. & White, R. H. Identification of a 5'-deoxyadenosine deaminase in *Methanocaldococcus jannaschii* and its possible role in recycling the radical S-adenosylmethionine enzyme reaction product 5'-deoxyadenosine. *J. Bacteriol.* **196**, 1064–1072 (2014).
226. Guan, R., Ho, M.-C., Almo, S. C. & Schramm, V. L. Methylthioinosine phosphorylase from *Pseudomonas aeruginosa*. Structure and annotation of a novel enzyme in quorum sensing. *Biochemistry (Mosc.)* **50**, 1247–1254 (2011).
227. Balakrishnan, R., Frohlich, M., Rahaim, P. T., Backman, K. & Yocum, R. R. Appendix. Cloning and sequence of the gene encoding enzyme E-1 from the methionine salvage pathway of *Klebsiella oxytoca*. *J. Biol. Chem.* **268**, 24792–24795 (1993).
228. Ellens, K. W. *et al.* Evidence that glutamine transaminase and omega-amidase potentially act in tandem to close the methionine salvage cycle in bacteria and plants. *Phytochemistry* **113**, 160–169 (2015).
229. Heilbronn, J., Wilson, J. & Berger, B. J. Tyrosine aminotransferase catalyzes the final step of methionine recycling in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **181**, 1739–1747 (1999).
230. Berger, B. J., English, S., Chan, G. & Knodel, M. H. Methionine Regeneration and Aminotransferases in *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **185**, 2418–2431 (2003).
231. Venos, E. S., Knodel, M. H., Radford, C. L. & Berger, B. J. Branched-chain amino acid aminotransferase and methionine formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol.* **4**, 39 (2004).
232. Dolzan, M. *et al.* Crystal structure and reactivity of YbdL from *Escherichia coli* identify a methionine aminotransferase function. *FEBS Lett.* **571**, 141–146 (2004).
233. Flatley, J. *et al.* Transcriptional responses of *Escherichia coli* to S-nitrosoglutathione under defined chemostat conditions reveal major changes in methionine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 10065–10072 (2005).
234. Ashida, H. *et al.* A functional link between RuBisCO-like protein of *Bacillus* and photosynthetic RuBisCO. *Science* **302**, 286–290 (2003).
235. Nakano, T., Ohki, I., Yokota, A. & Ashida, H. MtnBD Is a Multifunctional Fusion Enzyme in the Methionine Salvage Pathway of *Tetrahymena thermophila*. *PLoS ONE* **8**, e67385 (2013).
236. Dai, Y., Pochapsky, T. C. & Abeles, R. H. Mechanistic studies of two dioxygenases in the methionine salvage pathway of *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemistry (Mosc.)* **40**, 6379–6387 (2001).
237. Wray, J. W. & Abeles, R. H. The methionine salvage pathway in *Klebsiella pneumoniae* and rat liver. Identification and characterization of two novel dioxygenases. *J. Biol. Chem.* **270**, 3147–3153 (1995).

238. Dai, Y., Wensink, P. C. & Abeles, R. H. One protein, two enzymes. *J. Biol. Chem.* **274**, 1193–1195 (1999).
239. Visscher, P. T. & Taylor, B. F. Demethylation of dimethylsulfoniopropionate to 3-mercaptopropionate by an aerobic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 4617–4619 (1994).
240. Taylor, B. F. & Gilchrist, D. C. New routes for aerobic biodegradation of dimethylsulfoniopropionate. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3581–3584 (1991).
241. Kiene, R. P. & Taylor, B. F. Demethylation of dimethylsulfoniopropionate and production of thiols in anoxic marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2208–2212 (1988).
242. van der Maarel, M., Jansen, M. & Hansen, T. A. Methanogenic conversion of 3-s-methylmercaptopropionate to 3-mercaptopropionate. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 48–51 (1995).
243. Wübbeler, J. H. *et al.* Unravelling the complete genome sequence of *Advenella mimigardefordensis* strain DPN7T and novel insights in the catabolism of the xenobiotic polythioester precursor 3,3'-dithiodipropionate. *Microbiol. Read. Engl.* **160**, 1401–1416 (2014).
244. Meinert, C. *et al.* Proteomic analysis of organic sulfur compound utilisation in *Advenella mimigardefordensis* strain DPN7T. *PLoS One* **12**, e0174256 (2017).
245. North, J. A. *et al.* Metabolic Regulation as a Consequence of Anaerobic 5-Methylthioadenosine Recycling in *Rhodospirillum rubrum*. *mBio* **7**, e00855-16 (2016).
246. Tabita, F. R. *et al.* Function, structure, and evolution of the RubisCO-like proteins and their RubisCO homologs. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **71**, 576–599 (2007).
247. Imker, H. J., Singh, J., Warlick, B. P., Tabita, F. R. & Gerlt, J. A. Mechanistic Diversity in the RuBisCO Superfamily: A Novel Isomerization Reaction Catalyzed by the RuBisCO-like Protein from *Rhodospirillum rubrum*[†]. *Biochemistry (Mosc.)* **47**, 11171–11173 (2008).
248. Warlick, B. P. *et al.* 1-methylthio-D-xylulose 5-phosphate methylsulfurylase: a novel route to 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry (Mosc.)* **51**, 8324–8326 (2012).
249. Cho, K. *et al.* Integration of untargeted metabolomics with transcriptomics reveals active metabolic pathways. *Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc.* **2014**, (2014).
250. Warlick, B. P. Functional discovery and promiscuity in the RuBisCO superfamily. (University of Illinois at Urbana-Champaign, 2013).
251. Singh, J. & Tabita, F. R. Roles of RubisCO and the RubisCO-Like Protein in 5-Methylthioadenosine Metabolism in the Nonsulfur Purple Bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **192**, 1324–1331 (2010).
252. Dey, S., North, J. A., Sriram, J., Evans, B. S. & Tabita, F. R. In Vivo Studies in *Rhodospirillum rubrum* Indicate That Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) Catalyzes Two Obligatorily Required and Physiologically Significant Reactions for Distinct Carbon and Sulfur Metabolic Pathways. *J. Biol. Chem.* **290**, 30658–30668 (2015).

253. Miller, A. R., North, J. A., Wildenthal, J. A. & Tabita, F. R. Two Distinct Aerobic Methionine Salvage Pathways Generate Volatile Methanethiol in *Rhodospseudomonas palustris*. *mBio* **9**, (2018).
254. Tchong, S.-I., Xu, H. & White, R. H. L-Cysteine Desulfidase: An [4Fe-4S] Enzyme Isolated from *Methanocaldococcus jannaschii* That Catalyzes the Breakdown of L-Cysteine into Pyruvate, Ammonia, and Sulfide[†]. *Biochemistry (Mosc.)* **44**, 1659–1670 (2005).
255. Mendez, J. *et al.* A Novel *cdsAB* Operon Is Involved in the Uptake of L-Cysteine and Participates in the Pathogenesis of *Yersinia ruckeri*. *J. Bacteriol.* **193**, 944–951 (2011).
256. Gu, H. *et al.* Novel Cysteine Desulfidase CdsB Involved in Releasing Cysteine Repression of Toxin Synthesis in *Clostridium difficile*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, (2018).
257. Fukamachi, H., Nakano, Y., Yoshimura, M. & Koga, T. Cloning and characterization of the L-cysteine desulhydrase gene of *Fusobacterium nucleatum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**, 75–80 (2002).
258. Dominy, J. E., Simmons, C. R., Karplus, P. A., Gehring, A. M. & Stipanuk, M. H. Identification and Characterization of Bacterial Cysteine Dioxygenases: a New Route of Cysteine Degradation for Eubacteria. *J. Bacteriol.* **188**, 5561–5569 (2006).
259. Tchesnokov, E. P. *et al.* The cysteine dioxygenase homologue from *Pseudomonas aeruginosa* is a 3-mercaptopropionate dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **290**, 24424–24437 (2015).
260. Agnello, G., Chang, L. L., Lamb, C. M., Georgiou, G. & Stone, E. M. Discovery of a Substrate Selectivity Motif in Amino Acid Decarboxylases Unveils a Taurine Biosynthesis Pathway in Prokaryotes. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2264–2271 (2013).
261. Deng, J. *et al.* Molecular Characterization and Directed Evolution of a Metagenome-Derived L-Cysteine Sulfinatase Decarboxylase. *Food Technol. Biotechnol.* **56**, 117–123 (2018).
262. Lambrecht, J. A., Flynn, J. M. & Downs, D. M. Conserved YjgF Protein Family Deaminates Reactive Enamine/Imine Intermediates of Pyridoxal 5'-Phosphate (PLP)-dependent Enzyme Reactions. *J. Biol. Chem.* **287**, 3454–3461 (2012).
263. Liu, M., Nauta, A., Francke, C. & Siezen, R. J. Comparative Genomics of Enzymes in Flavor-Forming Pathways from Amino Acids in Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4590–4600 (2008).
264. Irmeler, S., Raboud, S., Beisert, B., Rauhut, D. & Berthoud, H. Cloning and Characterization of Two *Lactobacillus casei* Genes Encoding a Cystathionine Lyase. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 99–106 (2008).
265. Guggenheim, S. & Flavin, M. Cystathionine gamma-synthase. A pyridoxal phosphate enzyme catalyzing rapid exchanges of beta and alpha hydrogen atoms in amino acids. *J. Biol. Chem.* **244**, 6217–6227 (1969).
266. Smacchi, E. & Gobetti, M. Purification and characterization of cystathionine γ -lyase from *Lactobacillus fermentum* DT41. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**, 197–202 (1998).

267. Liu, M., van Enkevort, F. H. J. & Siezen, R. J. Genome update: lactic acid bacteria genome sequencing is booming. *Microbiol. Read. Engl.* **151**, 3811–3814 (2005).
268. Doherty, N. C. *et al.* In *Helicobacter pylori*, LuxS Is a Key Enzyme in Cysteine Provision through a Reverse Transsulfuration Pathway. *J. Bacteriol.* **192**, 1184–1192 (2010).
269. Günther, E., Petruschka, L. & Herrmann, H. Reverse transsulfuration pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Z. Allg. Mikrobiol.* **19**, 439–442 (1979).
270. Nagasawa, T., Kanzaki, H. & Yamada, H. Cystathionine gamma-lyase of *Streptomyces phaeochromogenes*. The occurrence of cystathionine gamma-lyase in filamentous bacteria and its purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **259**, 10393–10403 (1984).
271. Wheeler, P. R. *et al.* Functional Demonstration of Reverse Transsulfuration in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex Reveals That Methionine Is the Preferred Sulfur Source for Pathogenic Mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **280**, 8069–8078 (2005).
272. Mino, K. & Ishikawa, K. Characterization of a Novel Thermostable O-Acetylserine Sulfhydrylase from *Aeropyrum pernix* K1. *J. Bacteriol.* **185**, 2277–2284 (2003).
273. Kruger, W. D. & Cox, D. R. A yeast system for expression of human cystathionine beta-synthase: structural and functional conservation of the human and yeast genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 6614–6618 (1994).
274. Maclean, K. N., Janosík, M., Oliveriusová, J., Kery, V. & Kraus, J. P. Transsulfuration in *Saccharomyces cerevisiae* is not dependent on heme: purification and characterization of recombinant yeast cystathionine beta-synthase. *J. Inorg. Biochem.* **81**, 161–171 (2000).
275. Ono, B.-I. *et al.* Purification of properties of *Saccharomyces cerevisiae* cystathionine β -synthase. *Yeast* **10**, 333–339 (1994).
276. Yamagata, S., D'Andrea, R. J., Fujisaki, S., Isaji, M. & Nakamura, K. Cloning and bacterial expression of the CYS3 gene encoding cystathionine gamma-lyase of *Saccharomyces cerevisiae* and the physicochemical and enzymatic properties of the protein. *J. Bacteriol.* **175**, 4800–4808 (1993).
277. Kudou, D. *et al.* Structure of the Antitumour Enzyme L-Methionine -Lyase from *Pseudomonas putida* at 1.8 Å Resolution. *J. Biochem. (Tokyo)* **141**, 535–544 (2007).
278. Mamaeva, D. V. *et al.* Structure of *Citrobacter freundii* L-methionine gamma-lyase. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **61**, 546–549 (2005).
279. Jia, K.-Z. *et al.* *Clonostachys rosea* demethylase STR3 controls the conversion of methionine into methanethiol. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
280. Esaki, N. & Soda, K. L-methionine gamma-lyase from *Pseudomonas putida* and *Aeromonas*. *Methods Enzymol.* **143**, 459–465 (1987).
281. Nakayama, T. *et al.* Purification of bacterial L-methionine gamma-lyase. *Anal. Biochem.* **138**, 421–424 (1984).

282. Inoue, H. *et al.* Structural analysis of the L-methionine γ -lyase gene from *Pseudomonas putida*. *J. Biochem. (Tokyo)* **117**, 1120–1125 (1995).
283. Bonnarme, P., Psoni, L. & Spinnler, H. E. Diversity of L-methionine catabolism pathways in cheese-ripening bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5514–5517 (2000).
284. Dias, null & Weimer, null. Purification and characterization of L-methionine gamma-lyase from *brevibacterium linens* BL2. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3327–3331 (1998).
285. Amarita, F. *et al.* Identification and Functional Analysis of the Gene Encoding Methionine- -Lyase in *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 7348–7354 (2004).
286. Suwabe, K., Yoshida, Y., Nagano, K. & Yoshimura, F. Identification of an L-methionine -lyase involved in the production of hydrogen sulfide from L-cysteine in *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586. *Microbiology* **157**, 2992–3000 (2011).
287. Bonnarme, P. Methylthioacetaldehyde, a possible intermediate metabolite for the production of volatile sulphur compounds from -methionine by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **236**, 85–90 (2004).
288. Yvon, M., Thirouin, S., Rijnen, L., Fromentier, D. & Gripon, J. C. An aminotransferase from *Lactococcus lactis* initiates conversion of amino acids to cheese flavor compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 414–419 (1997).
289. Yvon, M., Chambellon, E., Bolotin, A. & Roudot-Algaron, F. Characterization and role of the branched-chain aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCD0 763. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 571–577 (2000).
290. Yang, S. F. Biosynthesis of ethylene. Ethylene formation from methional by horseradish peroxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 481–487 (1967).
291. Primrose, S. B. Evaluation of the role of methional, 2-keto-4-methylthiobutyric acid and peroxidase in ethylene formation by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 519–528 (1977).
292. Ince, J. E. & Knowles, C. J. Ethylene formation by cell-free extracts of *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **146**, 151–158 (1986).
293. Fukuda, H., Takahashi, M., Fujii, T., Tazaki, M. & Ogawa, T. An NADH:Fe(III)EDTA oxidoreductase from *Cryptococcus albidus*: an enzyme involved in ethylene production in vivo? *FEMS Microbiol. Lett.* **51**, 107–111 (1989).
294. Ogawa, T., Takahashi, M., Fujii, T., Tazaki, M. & Fukuda, H. The Role of NADH:Fe(III)EDTA Oxidoreductase in Ethylene Formation from 2-Keto-4-Methylthiobutyrate. *J. Ferment. Bioeng.* **69**, 287–291 (1990).
295. Konings, W. N., Kuipers, O. P. & Veld, J. H. J. H. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the Sixth Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications, 19-23 September 1999, Veldhoven, the Netherlands.* (Springer Netherlands, 1999).

296. Suylen, G. M. H., Large, P. J., Van Dijken, J. P. & Kuenen, J. G. Methyl mercaptan oxidase, a key enzyme in the metabolism of methylated sulphur compounds by *Hyphomicrobium* EG. *Microbiology* **133**, 2989–2997 (1987).
297. Pol, A. *et al.* Mutations in SELENBP1, encoding a novel human methanethiol oxidase, cause extraoral halitosis. *Nat. Genet.* **50**, 120–129 (2018).
298. Gould, W. D. & Kanagawa, T. Purification and properties of methyl mercaptan oxidase from *Thiobacillus thioparus* TK-m. *Microbiology* **138**, 217–221 (1992).
299. Kim, S.-J., Shin, H.-J., Kim, Y.-C., Lee, D.-S. & Yang, J.-W. Isolation and purification of methyl mercaptan oxidase from *Rhodococcus rhodochrous* for mercaptan detection. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**, 465–468 (2000).
300. Lee, H.-H., Kim, S.-J., Shin, H.-J., Park, J.-Y. & Yang, J.-W. Purification and characterization of methyl mercaptan oxidase from *Thiobacillus thioparus* for mercaptan detection. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **7**, 375–379 (2002).
301. Eyice, Ö. *et al.* Bacterial SBP56 identified as a Cu-dependent methanethiol oxidase widely distributed in the biosphere. *ISME J.* **12**, 145–160 (2018).
302. Carrión, O. *et al.* A novel pathway producing dimethylsulphide in bacteria is widespread in soil environments. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
303. Horinouchi, M., Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H. & Omori, T. Cloning and characterization of genes encoding an enzyme which oxidizes dimethyl sulfide in *Acinetobacter* sp. strain 20B. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 99–105 (1997).
304. Cadieux, E., Vrajmasu, V., Achim, C., Powlowski, J. & Münck, E. Biochemical, Mössbauer, and EPR studies of the diiron cluster of phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF 600. *Biochemistry (Mosc.)* **41**, 10680–10691 (2002).
305. Horinouchi, M., Yoshida, T., Nojiri, H., Yamane, H. & Omori, T. Polypeptide Requirement of Multicomponent Monooxygenase DsoABCDE for Dimethyl Sulfide Oxidizing Activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**, 1765–1771 (1999).
306. Powlowski, J., Sealy, J., Shingler, V. & Cadieux, E. On the role of DmpK, an auxiliary protein associated with multicomponent phenol hydroxylase from *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Biol. Chem.* **272**, 945–951 (1997).
307. Yee, L. *et al.* Complete Genome Sequence of a Dimethyl Sulfide-Utilizing Bacterium, *Acinetobacter guillouiae* Strain 20B (NBRC 110550). *Genome Announc.* **2**, (2014).
308. Rothery, R. A., Workun, G. J. & Weiner, J. H. The prokaryotic complex iron-sulfur molybdoenzyme family. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**, 1897–1929 (2008).
309. Sambasivarao, D. & Weiner, J. H. Dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*: an investigation of function and assembly by use of in vivo complementation. *J. Bacteriol.* **173**, 5935–5943 (1991).

310. Trieber, C. A., Rothery, R. A. & Weiner, J. H. Multiple pathways of electron transfer in dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 7103–7109 (1994).
311. Tang, H., Rothery, R. A., Voss, J. E. & Weiner, J. H. Correct assembly of iron-sulfur cluster F50 into *Escherichia coli* dimethyl sulfoxide reductase (DmsABC) is a prerequisite for molybdenum cofactor insertion. *J. Biol. Chem.* **286**, 15147–15154 (2011).
312. Chen, Y., Patel, N. A., Crombie, A., Scrivens, J. H. & Murrell, J. C. Bacterial flavin-containing monooxygenase is trimethylamine monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17791–17796 (2011).
313. Lidbury, I. *et al.* A mechanism for bacterial transformation of dimethylsulfide to dimethylsulfoxide: a missing link in the marine organic sulfur cycle. *Environ. Microbiol.* **18**, 2754–2766 (2016).
314. Wicht, D. K. The reduced flavin-dependent monooxygenase SfnG converts dimethylsulfone to methanesulfinate. *Arch. Biochem. Biophys.* **604**, 159–166 (2016).
315. Eichhorn, E. & Leisinger, T. *Escherichia coli* utilizes methanesulfonate and L-cysteate as sole sulfur sources for growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**, 271–275 (2001).
316. Eichhorn, E., van der Ploeg, J. R. & Leisinger, T. Characterization of a two-component alkanesulfonate monooxygenase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 26639–26646 (1999).
317. Gao, B. & Ellis, H. R. Altered mechanism of the alkanesulfonate FMN reductase with the monooxygenase enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 1137–1145 (2005).
318. Abdurachim, K. & Ellis, H. R. Detection of protein-protein interactions in the alkanesulfonate monooxygenase system from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 8153–8159 (2006).
319. Eichhorn, E., Davey, C. A., Sargent, D. F., Leisinger, T. & Richmond, T. J. Crystal structure of *Escherichia coli* alkanesulfonate monooxygenase SsuD. *J. Mol. Biol.* **324**, 457–468 (2002).
320. Zhan, X., Carpenter, R. A. & Ellis, H. R. Catalytic importance of the substrate binding order for the FMNH₂-dependent alkanesulfonate monooxygenase enzyme. *Biochemistry (Mosc.)* **47**, 2221–2230 (2008).
321. Xiong, J. & Ellis, H. R. Deletional studies to investigate the functional role of a dynamic loop region of alkanesulfonate monooxygenase. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 898–906 (2012).
322. Kertesz, M. A., Schmidt-Larbig, K. & Wüest, T. A Novel Reduced Flavin Mononucleotide-Dependent Methanesulfonate Sulfonatase Encoded by the Sulfur-Regulatedmsu Operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**, 1464–1473 (1999).
323. Endoh, T. *et al.* Characterization and identification of genes essential for dimethyl sulfide utilization in *Pseudomonas putida* strain DS1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 83–91 (2003).
324. de Marco, P. *et al.* Molecular analysis of a novel methanesulfonic acid monooxygenase from the methylotroph *Methylosulfonomonas methylovora*. *J. Bacteriol.* **181**, 2244–2251 (1999).

325. Higgins, T. P., De Marco, P. & Murrell, J. C. Purification and molecular characterization of the electron transfer protein of methanesulfonic acid monooxygenase. *J. Bacteriol.* **179**, 1974–1979 (1997).
326. Howard, E. C. *et al.* Bacterial taxa that limit sulfur flux from the ocean. *Science* **314**, 649–652 (2006).
327. Erickson, D. J., Ghan, S. J. & Penner, J. E. Global ocean-to-atmosphere dimethyl sulfide flux. *J. Geophys. Res.* **95**, 7543 (1990).
328. Otte, M. L., Wilson, G., Morris, J. T. & Moran, B. M. Dimethylsulphoniopropionate (DMSP) and related compounds in higher plants. *J. Exp. Bot.* **55**, 1919–1925 (2004).
329. Rhodes, D., Gage, D. A., Cooper, A. J. L. & Hanson, A. D. S-Methylmethionine Conversion to Dimethylsulfonylpropionate: Evidence for an Unusual Transamination Reaction. *Plant Physiol.* **115**, 1541–1548 (1997).
330. Trossat, C., Nolte, K. D. & Hanson, A. D. Evidence That the Pathway of Dimethylsulfonylpropionate Biosynthesis Begins in the Cytosol and Ends in the Chloroplast. *Plant Physiol.* **111**, 965–973 (1996).
331. Kahn, V. Glycine as a Methyl Donor in Dimethyl- β -Propiothetin Synthesis. *J. Exp. Bot.* **15**, 225–231 (1964).
332. Gage, D. A. *et al.* A new route for synthesis of dimethylsulphonylpropionate in marine algae. *Nature* **387**, 891–894 (1997).
333. Etschmann, M. M. W. *et al.* Production of the aroma chemicals 3-(methylthio)-1-propanol and 3-(methylthio)-propylacetate with yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**, 579–587 (2008).
334. Vuralhan, Z. *et al.* Physiological characterization of the ARO10-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3276–3284 (2005).
335. Reisch, C. R., Moran, M. A. & Whitman, W. B. Bacterial Catabolism of Dimethylsulfonylpropionate (DMSP). *Front. Microbiol.* **2**, (2011).
336. Visscher, P. T., Diaz, M. R. & Taylor, B. F. Enumeration of bacteria which cleave or demethylate dimethylsulfonylpropionate in the Caribbean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser. Oldendorf* **89**, 293–296 (1992).
337. van der Maarel, M. J., Jansen, M., Haanstra, R., Meijer, W. G. & Hansen, T. A. Demethylation of dimethylsulfonylpropionate to 3-S-methylmercaptopyruvate by marine sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 3978–3984 (1996).
338. Reisch, C. R., Moran, M. A. & Whitman, W. B. Dimethylsulfonylpropionate-dependent demethylase (DmdA) from *Pelagibacter ubique* and *Silicibacter pomeroyi*. *J. Bacteriol.* **190**, 8018–8024 (2008).
339. Maarel, M. J. E. C. van der, Quist, P., Dijkhuizen, L. & Hansen, T. A. Anaerobic degradation of dimethylsulfonylpropionate to 3-*S*-methylmercaptopyruvate

by a marine *Desulfobacterium* strain. *Arch. Microbiol.* **160**, 411–412 (1993).

340. Ledyard, K. M., DeLong, E. F. & Dacey, J. W. H. Characterization of a DMSP-degrading bacterial isolate from the Sargasso Sea. *Arch. Microbiol.* **160**, 312–318 (1993).

341. González, J. M., Kiene, R. P. & Moran, M. A. Transformation of sulfur compounds by an abundant lineage of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3810–3819 (1999).

342. Kiene, R. P., Linn, L. J., González, J., Moran, M. A. & Bruton, J. A. Dimethylsulfoniopropionate and methanethiol are important precursors of methionine and protein-sulfur in marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4549–4558 (1999).

343. Wagner, C. & Stadtman, E. R. Bacterial fermentation of dimethyl-beta-propiothetin. *Arch. Biochem. Biophys.* **98**, 331–336 (1962).

344. Bacic, M. K. & Yoch, D. C. In Vivo Characterization of Dimethylsulfoniopropionate Lyase in the Fungus *Fusarium lateritium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 106–111 (1998).

345. de Souza, M. P. & Yoch, D. C. Purification and characterization of dimethylsulfoniopropionate lyase from an alcaligenes-like dimethyl sulfide-producing marine isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 21–26 (1995).

346. Der Maarel, M. J. E. C., Aukema, W. & Hansen, T. A. Purification and characterization of a dimethylsulfoniopropionate cleaving enzyme from *Desulfovibrio acrylicus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **143**, 241–245 (1996).

347. Curson, A. R. J., Rogers, R., Todd, J. D., Brearley, C. A. & Johnston, A. W. B. Molecular genetic analysis of a dimethylsulfoniopropionate lyase that liberates the climate-changing gas dimethylsulfide in several marine alpha-proteobacteria and *Rhodobacter sphaeroides*. *Environ. Microbiol.* **10**, 757–767 (2008).

348. Curson, A. R. J., Sullivan, M. J., Todd, J. D. & Johnston, A. W. B. DddY, a periplasmic dimethylsulfoniopropionate lyase found in taxonomically diverse species of Proteobacteria. *ISME J.* **5**, 1191–1200 (2011).

349. Kirkwood, M., Todd, J. D., Rypien, K. L. & Johnston, A. W. B. The opportunistic coral pathogen *Aspergillus sydowii* contains dddP and makes dimethyl sulfide from dimethylsulfoniopropionate. *ISME J.* **4**, 147–150 (2010).

350. Raina, J.-B., Dinsdale, E. A., Willis, B. L. & Bourne, D. G. Do the organic sulfur compounds DMSP and DMS drive coral microbial associations? *Trends Microbiol.* **18**, 101–108 (2010).

351. Brummett, A. E., Schnicker, N. J., Crider, A., Todd, J. D. & Dey, M. Biochemical, Kinetic, and Spectroscopic Characterization of *Ruegeria pomeroyi* DddW—A Mononuclear Iron-Dependent DMSP Lyase. *PLOS ONE* **10**, e0127288 (2015).

352. Sun, J. *et al.* The abundant marine bacterium *Pelagibacter* simultaneously catabolizes dimethylsulfoniopropionate to the gases dimethyl sulfide and methanethiol. *Nat. Microbiol.* **1**, (2016).

353. Schnicker, N. J., De Silva, S. M., Todd, J. D. & Dey, M. Structural and Biochemical Insights into Dimethylsulfoniopropionate Cleavage by Cofactor-Bound DddK from the Prolific Marine Bacterium *Pelagibacter*. *Biochemistry (Mosc.)* **56**, 2873–2885 (2017).
354. Lei, L., Cherukuri, K. P., Alcolombri, U., Meltzer, D. & Tawfik, D. S. The Dimethylsulfoniopropionate (DMSP) Lyase and Lyase-Like Cupin Family Consists of *Bona Fide* DMSP lyases as Well as Other Enzymes with Unknown Function. *Biochemistry (Mosc.)* (2018). doi:10.1021/acs.biochem.8b00097
355. Todd, J. D. *et al.* Structural and regulatory genes required to make the gas dimethyl sulfide in bacteria. *Science* **315**, 666–669 (2007).
356. Ansele, J. H., Pellechia, P. J. & Yoch, D. C. Nuclear magnetic resonance analysis of [1-¹³C]dimethylsulfoniopropionate (DMSP) and [1-¹³C]acrylate metabolism by a DMSP lyase-producing marine isolate of the alpha-subclass of Proteobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3134–3139 (2001).
357. Alcolombri, U., Laurino, P., Lara-Astiaso, P., Vardi, A. & Tawfik, D. S. DddD is a CoA-transferase/lyase producing dimethyl sulfide in the marine environment. *Biochemistry (Mosc.)* **53**, 5473–5475 (2014).
358. Boden, R. *et al.* Purification and Characterization of Dimethylsulfide Monooxygenase from *Hypomicrobium sulfonivorans*. *J. Bacteriol.* **193**, 1250–1258 (2011).
359. Young, D. M., Parke, D. & Ornston, L. N. Opportunities for genetic investigation afforded by *Acinetobacter baylyi*, a nutritionally versatile bacterial species that is highly competent for natural transformation. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**, 519–551 (2005).
360. Gerischer, U., Jerg, B. & Fischer, R. Spotlight on the *Acinetobacter baylyi* Beta-Ketoadipate Pathway: Multiple Levels of Regulation. in *Acinetobacter molecular microbiology* 203–230 (Caister Academic Press, 2008).
361. de Vries, J. & Wackernagel, W. Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 2094–2099 (2002).
362. Fournier, P.-E. *et al.* Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* **2**, e7 (2006).
363. Touchon, M. *et al.* The Genomic Diversification of the Whole *Acinetobacter* Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences. *Genome Biol. Evol.* **6**, 2866–2882 (2014).
364. Barbe, V. Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5766–5779 (2004).
365. Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M.-L., Hamze, M. & Kempf, M. Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* Species. *Front. Microbiol.* **7**, 49 (2016).
366. Toren, A., Navon-Venezia, S., Ron, E. Z. & Rosenberg, E. Emulsifying activities of purified Alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1102–1106 (2001).

367. Kannisto, M., Efimova, E., Karp, M. & Santala, V. Growth and wax ester production of an *Acinetobacter baylyi* ADP1 mutant deficient in exopolysaccharide capsule synthesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 99–105 (2017).
368. de Berardinis, V., Durot, M., Weissenbach, J. & Salanoubat, M. *Acinetobacter baylyi* ADP1 as a model for metabolic system biology. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**, 568–576 (2009).
369. Elliott, K. T. & Neidle, E. L. *Acinetobacter baylyi* ADP1: transforming the choice of model organism. *IUBMB Life* **63**, 1075–1080 (2011).
370. Santala, S. *et al.* Improved triacylglycerol production in *Acinetobacter baylyi* ADP1 by metabolic engineering. *Microb. Cell Factories* **10**, 36 (2011).
371. Santala, S., Efimova, E., Koskinen, P., Karp, M. T. & Santala, V. Rewiring the wax ester production pathway of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *ACS Synth. Biol.* **3**, 145–151 (2014).
372. Ratajczak, A., Geissdörfer, W. & Hillen, W. Expression of alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. Strain ADP1 is induced by a broad range of n-alkanes and requires the transcriptional activator AlkR. *J. Bacteriol.* **180**, 5822–5827 (1998).
373. Ratajczak, A., Geissdörfer, W. & Hillen, W. Alkane hydroxylase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1 is encoded by alkM and belongs to a new family of bacterial integral-membrane hydrocarbon hydroxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1175–1179 (1998).
374. Defraia, C. T., Schmelz, E. A. & Mou, Z. A rapid biosensor-based method for quantification of free and glucose-conjugated salicylic acid. *Plant Methods* **4**, 28 (2008).
375. Metzgar, D. *et al.* *Acinetobacter* sp. ADP1: an ideal model organism for genetic analysis and genome engineering. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5780–5790 (2004).
376. Perchat, N. *et al.* Elucidation of the trigonelline degradation pathway reveals previously undescribed enzymes and metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E4358–E4367 (2018).
377. Stuani, L. *et al.* Novel metabolic features in *Acinetobacter baylyi* ADP1 revealed by a multiomics approach. *Metabolomics Off. J. Metabolomic Soc.* **10**, 1223–1238 (2014).
378. Aghaie, A. *et al.* New insights into the alternative D-glucarate degradation pathway. *J. Biol. Chem.* **283**, 15638–15646 (2008).
379. Mirza, I. A., Nazi, I., Korczynska, M., Wright, G. D. & Berghuis, A. M. Crystal Structure of Homoserine Transacetylase from *Haemophilus influenzae* Reveals a New Family of α/β -Hydrolases[†]. *Biochemistry (Mosc.)* **44**, 15768–15773 (2005).
380. Matthews, R. G. & Hondorp, E. R. Methionine. *EcoSal Plus* **2**, (2006).
381. Michael, A. J. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea. *J. Biol. Chem.* **291**, 14896–14903 (2016).
382. Skiebe, E. *et al.* Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **302**, 117–128 (2012).

383. Proschak, A. *et al.* Structure and biosynthesis of fimsbactins A-F, siderophores from *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **14**, 633–638 (2013).
384. Yamamoto, S., Nagata, S. & Kusaba, K. Purification and characterization of homospermidine synthase in *Acinetobacter tartarogenes* ATCC 31105. *J. Biochem. (Tokyo)* **114**, 45–49 (1993).
385. Krossa, S., Faust, A., Ober, D. & Scheidig, A. J. Comprehensive Structural Characterization of the Bacterial Homospermidine Synthase-an Essential Enzyme of the Polyamine Metabolism. *Sci. Rep.* **6**, 19501 (2016).
386. Mansilla, M. C. & de Mendoza, D. L-cysteine biosynthesis in *Bacillus subtilis*: identification, sequencing, and functional characterization of the gene coding for phosphoadenylylsulfate sulfotransferase. *J. Bacteriol.* **179**, 976–981 (1997).
387. Chartron, J. *et al.* Substrate recognition, protein dynamics, and iron-sulfur cluster in *Pseudomonas aeruginosa* adenosine 5'-phosphosulfate reductase. *J. Mol. Biol.* **364**, 152–169 (2006).
388. Xu, Z., Fang, X., Wood, T. K. & Huang, Z. J. A systems-level approach for investigating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *PLoS One* **8**, e57050 (2013).
389. Kertesz, M. A. Riding the sulfur cycle--metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 135–175 (2000).
390. Aslanidis, C. & de Jong, P. J. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res.* **18**, 6069–6074 (1990).
391. Vergne-Vaxelaire, C. *et al.* Nitrilase Activity Screening on Structurally Diverse Substrates: Providing Biocatalytic Tools for Organic Synthesis. *Adv. Synth. Catal.* **355**, 1763–1779 (2013).
392. Nagai, S. & Flavin, M. Acetylhomoserine. An intermediate in the fungal biosynthesis of methionine. *J. Biol. Chem.* **242**, 3884–3895 (1967).
393. Yamagata, S., D'Andrea, R. J., Fujisaki, S., Isaji, M. & Nakamura, K. Cloning and bacterial expression of the CYS3 gene encoding cystathionine gamma-lyase of *Saccharomyces cerevisiae* and the physicochemical and enzymatic properties of the protein. *J. Bacteriol.* **175**, 4800–4808 (1993).
394. Grynberg, M., Topczewski, J., Godzik, A. & Paszewski, A. The *Aspergillus nidulans* cysA gene encodes a novel type of serine O-acetyltransferase which is homologous to homoserine O-acetyltransferases. *Microbiol. Read. Engl.* **146 (Pt 10)**, 2695–2703 (2000).
395. Ma, Y. *et al.* Six new amino acid-auxotrophic markers for targeted gene integration and disruption in fission yeast. *Curr. Genet.* **52**, 97–105 (2007).
396. Sohn, M. J. *et al.* Novel cysteine-centered sulfur metabolic pathway in the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *PLoS One* **9**, e100725 (2014).
397. Born, T. L. & Blanchard, J. S. Enzyme-Catalyzed Acylation of Homoserine: Mechanistic Characterization of the *Escherichia coli* *metA* -Encoded Homoserine Transsuccinylase †. *Biochemistry (Mosc.)* **38**, 14416–14423 (1999).

398. Bogicevic, B. *et al.* Cysteine biosynthesis in *Lactobacillus casei*: identification and characterization of a serine acetyltransferase. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, (2016).
399. Flavin, M. & Slaughter, C. Synthesis of the Succinic Ester of Homoserine, a New Intermediate in the Bacterial Biosynthesis of Methionine^{*}. *Biochemistry (Mosc.)* **4**, 1370–1375 (1965).
400. Kredich, N. M. & Tomkins, G. M. The enzymic synthesis of L-cysteine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **241**, 4955–4965 (1966).
401. Sakai, A. *et al.* Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: N-succinylamino acid racemase and a new pathway for the irreversible conversion of D- to L-amino acids. *Biochemistry (Mosc.)* **45**, 4455–4462 (2006).
402. Bar-Even, A. *et al.* The Moderately Efficient Enzyme: Evolutionary and Physicochemical Trends Shaping Enzyme Parameters. *Biochemistry (Mosc.)* **50**, 4402–4410 (2011).
403. Brzywczy, J. & Paszewski, A. Sulfur amino acid metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*: occurrence of two O-acetylhomoserine sulfhydrylases and the lack of the reverse transsulfuration pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**, 171–174 (1994).
404. Ma, Y. *et al.* Six new amino acid-auxotrophic markers for targeted gene integration and disruption in fission yeast. *Curr. Genet.* **52**, 97–105 (2007).
405. Oda, K., Matoba, Y., Kumagai, T., Noda, M. & Sugiyama, M. Crystallographic study to determine the substrate specificity of an L-serine-acetylating enzyme found in the D-cycloserine biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **195**, 1741–1749 (2013).
406. Voet, D., Domenjoud, L. & Voet, J. G. Catalyse enzymatique. in *Biochimie* 506–557 (De Boeck, 2016).
407. Qian, W. *et al.* Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Genome Res.* **15**, 757–767 (2005).
408. Blomme, G. *et al.* Bacterial Diseases of Bananas and Enset: Current State of Knowledge and Integrated Approaches Toward Sustainable Management. *Front. Plant Sci.* **8**, 1290 (2017).
409. Liu, W. *et al.* Transcriptome profiling of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* grown in minimal medium MMX and rich medium NYG. *Res. Microbiol.* **164**, 466–479 (2013).
410. Watt, T. F., Vucur, M., Baumgarth, B., Watt, S. A. & Niehaus, K. Low molecular weight plant extract induces metabolic changes and the secretion of extracellular enzymes, but has a negative effect on the expression of the type-III secretion system in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J. Biotechnol.* **140**, 59–67 (2009).
411. Sherwood, M. T. Improved synthetic medium for the growth of *Rhizobium*. *J. Appl. Bacteriol.* **33**, 708–713 (1970).
412. Fujita, Y. & Takegawa, K. Characterization of two genes encoding putative cysteine synthase required for cysteine biosynthesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 306–311 (2004).

413. Burkhard, P., Tai, C.-H., Jansonius, J. N. & Cook, P. F. Identification of an allosteric anion-binding site on O-acetylserine sulfhydrylase: structure of the enzyme with chloride bound. *J. Mol. Biol.* **303**, 279–286 (2000).
414. Huang, B., Vetting, M. W. & Roderick, S. L. The Active Site of O-Acetylserine Sulfhydrylase Is the Anchor Point for Bienenzyme Complex Formation with Serine Acetyltransferase. *J. Bacteriol.* **187**, 3201–3205 (2005).
415. Wang, T. & Leyh, T. S. Three-stage assembly of the cysteine synthase complex from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **287**, 4360–4367 (2012).
416. Dharavath, S., Raj, I. & Gourinath, S. Structure-based mutational studies of O -acetylserine sulfhydrylase reveal the reason for the loss of cysteine synthase complex formation in *Brucella abortus*. *Biochem. J.* **474**, 1221–1239 (2017).
417. Kumagai, T. *et al.* Molecular Cloning and Heterologous Expression of a Biosynthetic Gene Cluster for the Antitubercular Agent D-Cycloserine Produced by *Streptomyces lavendulae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1132–1139 (2010).
418. Pendela, M. *et al.* Development of a liquid chromatographic method for the determination of related substances and assay of d-cycloserine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **47**, 807–811 (2008).
419. Kumagai, T. *et al.* High-Level Heterologous Production of d-Cycloserine by *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 7881–7887 (2015).
420. Uda, N. *et al.* Establishment of an *In Vitro* d-Cycloserine-Synthesizing System by Using O -Ureido-l-Serine Synthase and d-Cycloserine Synthetase Found in the Biosynthetic Pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2603–2612 (2013).
421. Noda, M. *et al.* Self-protection mechanism in D-cycloserine-producing *Streptomyces lavendulae*. Gene cloning, characterization, and kinetics of its alanine racemase and D-alanyl-D-alanine ligase, which are target enzymes of D-cycloserine. *J. Biol. Chem.* **279**, 46143–46152 (2004).
422. Toh-E, A. *et al.* Novel biosynthetic pathway for sulfur amino acids in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Genet.* **64**, 681–696 (2018).
423. Doherty, N. C. *et al.* In *Helicobacter pylori*, LuxS Is a Key Enzyme in Cysteine Provision through a Reverse Transsulfuration Pathway. *J. Bacteriol.* **192**, 1184–1192 (2010).
424. Boschi-Muller, S., Gand, A. & Branlant, G. The methionine sulfoxide reductases: Catalysis and substrate specificities. *Arch. Biochem. Biophys.* **474**, 266–273 (2008).
425. Hummerjohann, J. *et al.* Regulation of the sulfate starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: role of cysteine biosynthetic intermediates. *Microbiol. Read. Engl.* **144 (Pt 5)**, 1375–1386 (1998).
426. Chan, C.-M., Danchin, A., Marlière, P. & Sekowska, A. Paralogous metabolism: S-alkyl-cysteine degradation in *Bacillus subtilis*: Recovery of reduced sulphur using oxygen. *Environ. Microbiol.* **16**, 101–117 (2014).

427. Danchin, A. & Sekowska, A. The logic of metabolism and its fuzzy consequences: Paralogous metabolism. *Environ. Microbiol.* **16**, 19–28 (2014).
428. Tralau, T. *et al.* Transcriptomic analysis of the sulfate starvation response of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **189**, 6743–6750 (2007).
429. Kertesz, M. A., Leisinger, T. & Cook, A. M. Proteins induced by sulfate limitation in *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, or *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **175**, 1187–1190 (1993).
430. van der Ploeg, J. R., Eichhorn, E. & Leisinger, T. Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **176**, 1–8 (2001).
431. Kahnert, A. & Kertesz, M. A. Characterization of a Sulfur-regulated Oxygenative Alkylsulfatase from *Pseudomonas putida* S-313. *J. Biol. Chem.* **275**, 31661–31667 (2000).
432. Kredich, N. M. Biosynthesis of Cysteine. *EcoSal Plus* **3**, (2008).
433. Iwanicka-Nowicka, R. & Hryniewicz, M. M. A new gene, *cbl*, encoding a member of the LysR family of transcriptional regulators belongs to *Escherichia coli* *cys* regulon. *Gene* **166**, 11–17 (1995).
434. Farmer, K. L. & Thomas, M. S. Isolation and Characterization of *Burkholderia cenocepacia* Mutants Deficient in Pyochelin Production: Pyochelin Biosynthesis Is Sensitive to Sulfur Availability. *J. Bacteriol.* **186**, 270–277 (2004).
435. Penwell, W. F. *et al.* Discovery and Characterization of New Hydroxamate Siderophores, Baumannoferrin A and B, produced by *Acinetobacter baumannii*. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **16**, 1896–1904 (2015).
436. Schmidt, A. & Jäger, K. Open Questions about Sulfur Metabolism in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 325–349 (1992).
437. Lewis, T. A., Glassing, A., Harper, J. & Franklin, M. J. Role for ferredoxin:NAD(P)H oxidoreductase (FprA) in sulfate assimilation and siderophore biosynthesis in *Pseudomonads*. *J. Bacteriol.* **195**, 3876–3887 (2013).
438. Endoh, T. *et al.* Characterization and identification of genes essential for dimethyl sulfide utilization in *Pseudomonas putida* strain DS1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**, 83–91 (2003).
439. Kouzuma, A. *et al.* Transcription factors CysB and SfnR constitute the hierarchical regulatory system for the sulfate starvation response in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **190**, 4521–4531 (2008).
440. Endoh, T., Habe, H., Nojiri, H., Yamane, H. & Omori, T. The σ_{54} -dependent transcriptional activator SfnR regulates the expression of the *Pseudomonas putida* *sfnFG* operon responsible for dimethyl sulphone utilization: Regulation of dimethyl sulphone metabolic genes. *Mol. Microbiol.* **55**, 897–911 (2004).
441. Carrión, O. *et al.* A novel pathway producing dimethylsulphide in bacteria is widespread in soil environments. *Nat. Commun.* **6**, (2015).

442. Carrión, O. *et al.* Methanethiol-dependent dimethylsulfide production in soil environments. *ISME J.* **11**, 2379–2390 (2017).
443. Li, C.-Y. *et al.* Mechanistic Insights into Dimethylsulfoniopropionate Lyase DddY, a New Member of the Cupin Superfamily. *J. Mol. Biol.* **429**, 3850–3862 (2017).
444. Baud, D. *et al.* Synthesis of Mono- and Dihydroxylated Amino Acids with New α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases: Biocatalytic Oxidation of C–H Bonds. *ChemCatChem* **6**, 3012–3017 (2014).
445. Shimamoto, G. & Berk, R. S. Catabolism of taurine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **569**, 287–292 (1979).
446. Felux, A.-K., Denger, K., Weiss, M., Cook, A. M. & Schleheck, D. *Paracoccus denitrificans* PD1222 Utilizes Hypotaurine via Transamination Followed by Spontaneous Desulfination To Yield Acetaldehyde and, Finally, Acetate for Growth. *J. Bacteriol.* **195**, 2921–2930 (2013).
447. Uria-Nickelsen, M. R., Leadbetter, E. R. & Godchaux, W. Comparative aspects of utilization of sulfonate and other sulfur sources by *Escherichia coli* K12. *Arch. Microbiol.* **161**, 434–438 (1994).
448. Kamitani, H., Esaki, N., Tanaka, H. & Soda, K. Degradation of L-djenkolate catalyzed by S-alkylcysteine α,β -lyase from *Pseudomonas putida*. *J. Biochem. (Tokyo)* **109**, 645–649 (1991).

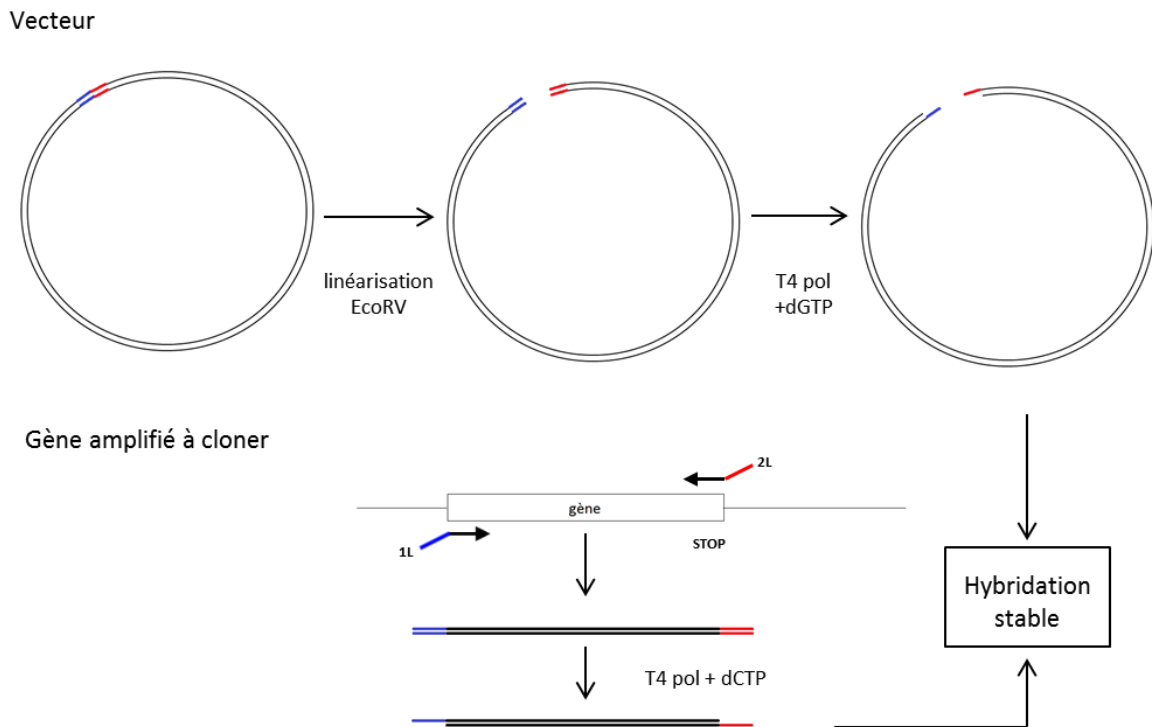
Annexes

Organisme	Classe	CGS gene annotation	Id. UniprotKB	Substrat testé	Article associé	Commentaire	CBL (Uniprot)	CBL gene annotation	Article associé	Commentaire	
<i>Escherichia coli</i> K12	Y-Proteobactéries	metB	P00935	OSH	Holbrook-Greene (1990)		P06721	metC	Wijesundera & Woods (1962) Rowbury (64) Balish (66); Dwivedi (82); Flint (96)	Sur extrait et purifiée	
							P23256	malY	Zdych-Peist (1995); Patrick (2007)	Partiellement purifiée et complémentation; est bifonctionnelle (maltose regulon repressor); struct. 2D et 3D homologue à metC	
							POA6B4	alr	Soo (2016)	Alanine racémase; croissance de <i>ΔmetC</i> avec multicopies plasmide <i>alr</i> ; pas d'activité promiscuitaire sur enzyme purifiée mais activité sur enzyme évolutive; réciprocité avec MetC, qui peut avoir l'activité <i>alr</i> après évolution dirigée mais non homologue	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	Y-Proteobactéries	?	?		Andersen (1998)	Activité déterminée par complémentation; autotrophe à la méthionine mais croissance sur cystathionine	?	?	idem	Croissance sur CTT; MetC annotée	
<i>Pseudomonas</i> FMS18	Y-Proteobactéries	nd	nd	nd	nd	nd	?	?	Morinaga-Tani (1983)	Sur extrait brut	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Y-Proteobactéries	nd	nd	nd	nd	<i>metB</i> annoté; insertion Tn entraîne autotrophie à la méthionine	Q02BA0	metC	Seifein-Lawrence (2006)	Prouvé par complémentation (autotrophie corrigée sur homocystéine mais pas sur CTT)	
<i>Salmonella enterica</i> (typhimurium)	Y-Proteobactéries	metB	A0A0E8MK22	OSH	Guggenheim-Flavin (1971) Kaplan-Flavin (1966)	Souche non formellement identifiée	P18949	metC	Ejim-D'Costa (2004)	Mutant autotrophe	
<i>Bordetella avium</i>	β-Proteobactéries	nd	nd	nd	idem	Une autre protéine immunoréactive migre avec MetC (~46kDa); l'auteur propose MetB	Q07703	metC	GentryWeek-Keith (1992)	Purifiée; nommée Ostéotoxine; homodimère; ~80kDa; 38Id/60% Simil avec CBL E coli; no "met box" et no repression by Methionine	
<i>Helicobacter pylori</i> (<i>Campylobacter pylori</i>)	ε-Proteobactéries	metB	Q1M0P5	OSH	Kong-Wu-Bai (2007)		nd	nd	nd	nd	metC annoté
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3526	Bacilli	nd	nd	OAH +++ & OSH +	Kanzaki-Kobayashi (1987)	Purifiée par activité; voir aussi activité OAH5	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Bacilli	metI	O31631	OAH	Auger-Yuen (2002)	Sur extrait brut (voir aussi activité OAH5)	O31632	metC	idem		Sur extrait
							Q08432	patB	Auger-Gomez (2005)	extrait (protéine recombinée chez E coli) Seulement 13% d'identité avec O31632	
							O05394	mccB yrhB	Hullo-Auger (2007)	purifiée; supposée plutôt homocystéine lyase car (i) expression forte sur Met et faible sur sulfate (ii) pas de croissance sur le double mutant metC/patB; (iii) croissance normale du mutant sur CTT (iv) E coli avec mcbB pousse bien sur homocystéine	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (<i>Streptococcus cremoris</i>)	Bacilli	nd	nd	nd	nd	CGS annotée	POC2T9	metC	Fernandez-vanDoesburg (2000)	Sur extrait (surexpression); Double activité β/γ lyase	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363	Bacilli	nd	nd	nd	nd	MetB annotée	A2RM21	metC	Dobric-Limsowtin (2000)	Purifiée; 94% d'identité avec POC2T9	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> (ATCC 11842 / DSM 20081 / JCM 1002 / NBRC 13953 / NCIMB 11778)	Bacilli	nd	nd	nd	nd	Non annotée parmi 1525 gènes	Q1GA02	patC	Aubel-Germond (2002)	Purifiée; variabilité intersouches	
<i>Lactobacillus casei</i> FAM18168 & FAM18108 (similaire à ATCC 334)	Bacilli	nd	nd	nd	nd	MetB annotée	B3TNN8 G0ZG50 G1BEN7	ctt1 & ctt2	Irmier (2009)	Purifiées; enzyme a les 3 activités CBL CGL; MGL ?	
<i>Oenococcus oeni</i> (<i>Leuconostoc oenos</i>) R1105 & R1106	Bacilli	nd	nd	nd	nd	Preuve indirecte que Cgl catalyse la formation de CTT	?	cgl	Knoll-duToit (2011)	Purifiées; sont aussi CGL ET CGS; MGL ?	
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> AX3 (100% identique à JCS1435)	Bacilli	nd	nd	nd	nd	MetB SH2548 annotée dans le génome; SH2635 similaire à CGS	Q4L332	SH2636	Trocraz-Benattia (2008)	Purifiée; non caractérisée sur Uniprot (Hypoth. Prot.)	
<i>Corynebacterium glutamicum</i> (<i>Brevibacterium saccharolyticum</i>)	Actinobactéries	metB		OAH	Hwang-Yeom (2002)	Sur extrait brut	Q93QC6	metC	Kim-Kim (2001); Ruckert (2003)		Sur extrait; non active
							?	aecD	Rosol & Pühler (1992)	Sur extrait; non homologue à metC; active in vivo	
<i>Corynebacterium striatum</i> AX20	Actinobactéries	nd	nd	nd	nd	MetB annotée sur souche ATCC 6940	Q64HCS	metC	Natsch (2004)	Sur extrait et purifiée; séquence indiquée dans article correspond à cet Uniprot ID	
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> IFO 3105		?	?	OSH	Kanzaki-Nagasawa (1986)	Sur extrait brut	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ATCC 25618 / H37Rv & strain CDC 1551 / Oshkosh	Actinobactéries	metB	P9WGB7 & P9WGB6	OSHS	Saha-Mukherjee (2009)	2 à 3 souches avec UniprotID différents mais séquences identiques; bifonctionnelle CGS/CGL	?	?	Wheeler (2004)	Sur extrait brut; pas d'annotation prédictive dans génome	
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	Deinococci	oah1 ou oah2	Q93177 ou Q76KS1	OAH	Shimizu-Yamagata (2001) Iwama-Hosokawa (2004)	Posséderait deux OAHs, dont une a l'activité CGS; voir aussi activité OAHs	Q5S126	TTHA1554	Arai-Nishimoto (2005)	Purifiée; non caractérisée sur Uniprot	

Annexe 1 : Résumé non exhaustif des activités CGS et CBL décrites dans la littérature. nd = non déterminé ; idem = articles dans les colonnes CGS et CBL sont identiques.

Organisme (Phylum)	Identifiant UniprotKB	Gène-annotation	Preuve expérimentale	Substrat préférentiel	Voie de transsulfuration (enzyme-activité CGS)	Article associé
<i>Thermus thermophilus</i> HB8 (Deinococci)	Q93177	oah1	enzyme purifiée	OAHS	possible (oah/-)	Shimizu-Yamagata 2001
	Q76K51	oah2				Iwama-Hosokawa 2004
<i>Leptospira meyeri</i> serovar semaranga (Spirochaetes)	P94890	metY	enzyme purifiée	OAHS	peu probable (nd/nd)	Belfaiza-Martel 1998
<i>Corynebacterium glutamicum</i> / <i>Brevibacterium saccharolyticum</i> (Actinobactéries)	H7C696	metY	extrait brut	OAHS	oui (MetY/+ou=)	Hwang-Yeom 2002 / Bolten-Schröder 2010
<i>Brevibacterium flavum</i> (Actinobactéries)	AOA0F6WPU3 ?	YH66_03565 ?	enzyme purifiée	OAHS	oui (?/-)	Ozaki-Shiio 1982
<i>Bacillus subtilis</i> strain 168 (Firmicutes)	O31631	metI	extrait brut (surexpression)	OAHS	oui (MetI/+)	Auger-Yuen 2002
<i>Bacillus sphaericus</i> IF0 3526 (Firmicutes)	nd	nd	enzyme purifiée	OAHS	oui (nd/+)	Kanzaki-Kobayashi 1987
<i>Bacillus stearothermophilus</i> CN3 (Firmicutes)	V6VMT8	T260_01385	enzyme purifiée	OAHS + CN-	nd	Omura-Ikemoto 2003
<i>Selenomonas ruminantium</i> HD4 (Firmicutes)	nd	metZ?	complémentation mutant	OAHS	possible (nd/nd)	Qin-Martin 2004
<i>Rhodospirillum rubrum</i> (Protéobactéries)	Q2RWB7	Rru_A0774	enzyme purifiée	OAHS + MeSH	nd	Tobias 2012
<i>Wolinella succinogenes</i> (Protéobactéries)	O31631	WS1012-metY	enzyme purifiée / modélisation	OAHS	possible (WS1015-MetZ/nd)	Krishnamoorthy 2010 / Tran 2011
<i>Pseudomonas putida</i> S-313 (Protéobactéries)	nd	nd	extrait brut	OSHS	peu probable (nd/nd)	Vermeij 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15692 / PAO1 / 1C / PRS 101 / LMG 12228 (Protéobactéries)	P55218	metZ	extrait brut	OSHS	possible (nd/nd)	Fogliano-Borne 1995
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Protéobactéries)	nd	metZ ?	complémentation mutant	OSHS (corrigé)	possible (nd/nd)	Anderssen 1998
<i>Pseudomonas</i> FM518 (Protéobactéries)	nd	nd	extrait brut	OAHS	possible (nd/nd)	Morinaga-Tani 1983

Annexe 2 : Résumé non exhaustif des activités O-acyl-L-homosérine sulfhydrylases (OAHS et OSHS) décrites dans la littérature. nd = non déterminé



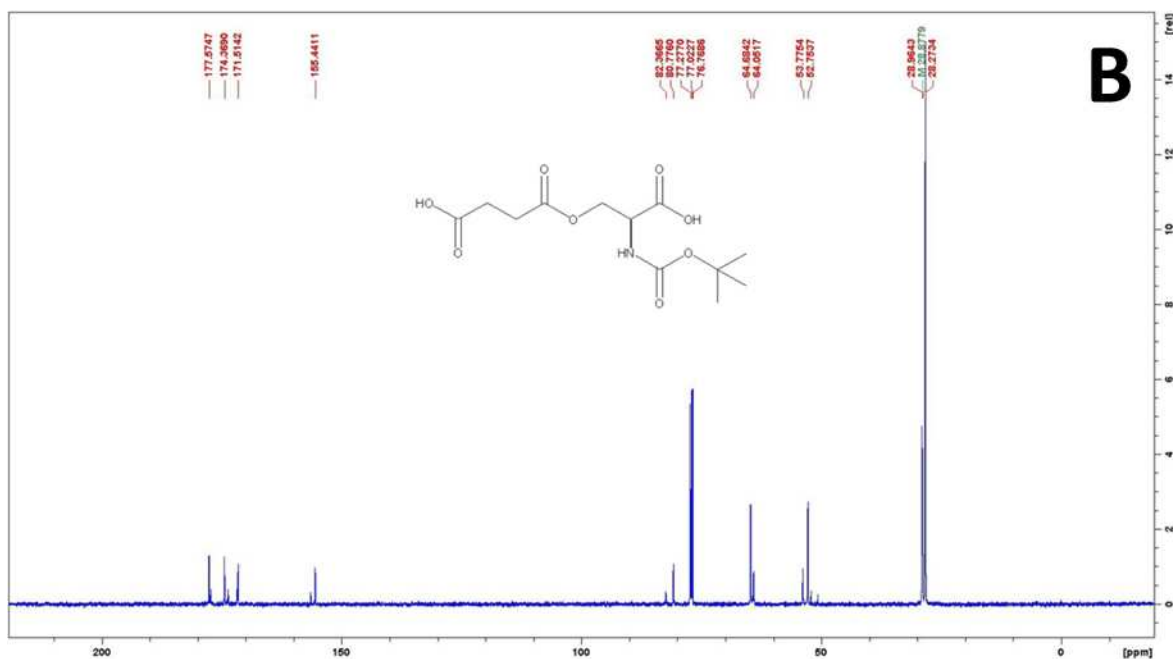
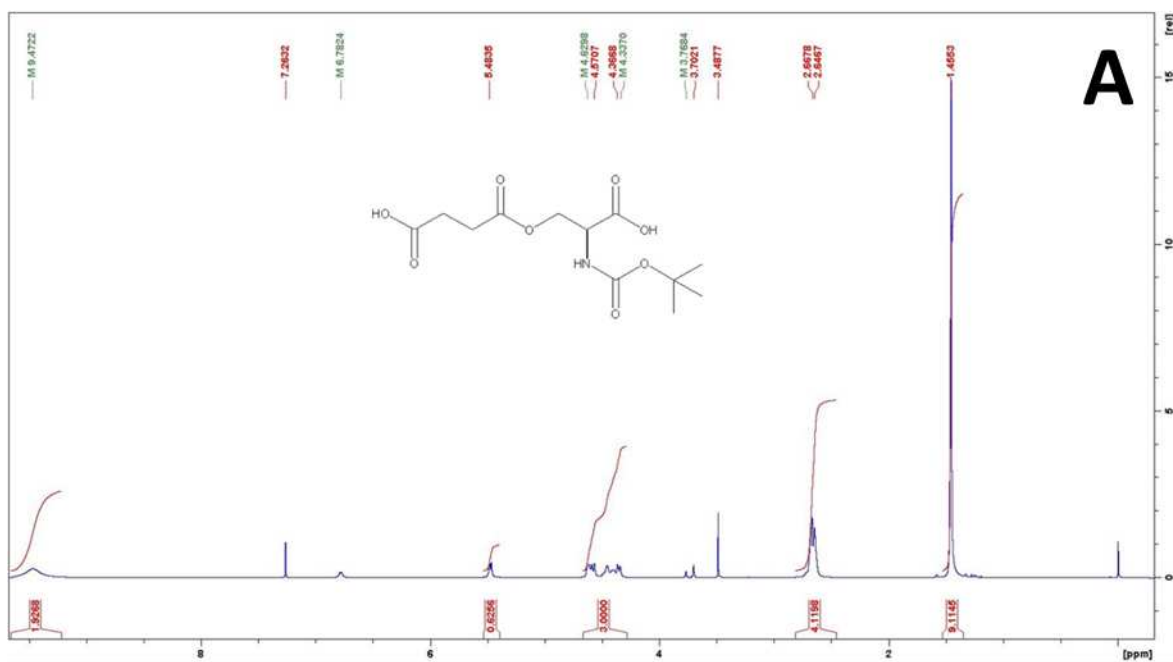
Annexe 3 : Méthode de clonage LIC (Ligation Independent Cloning) ou clonage sans enzyme de restriction ni ligation, décrite par Aslanidis et de Jong en 1990.

Cette technique de clonage est basée sur : l'utilisation des propriétés exonucléasiques 3'-5' de l'ADN polymérase T4 ; la production et l'utilisation d'extrémités simple brin longues et complémentaires sur l'insert et le vecteur ; l'utilisation de l'hybride insert/vecteur pour la transformation bactérienne sans l'intervention d'une ligase exogène. La méthode de clonage LIC consiste à rendre compatible le vecteur utilisé et l'insert en utilisant les propriétés de l'enzyme T4 DNA polymérase.

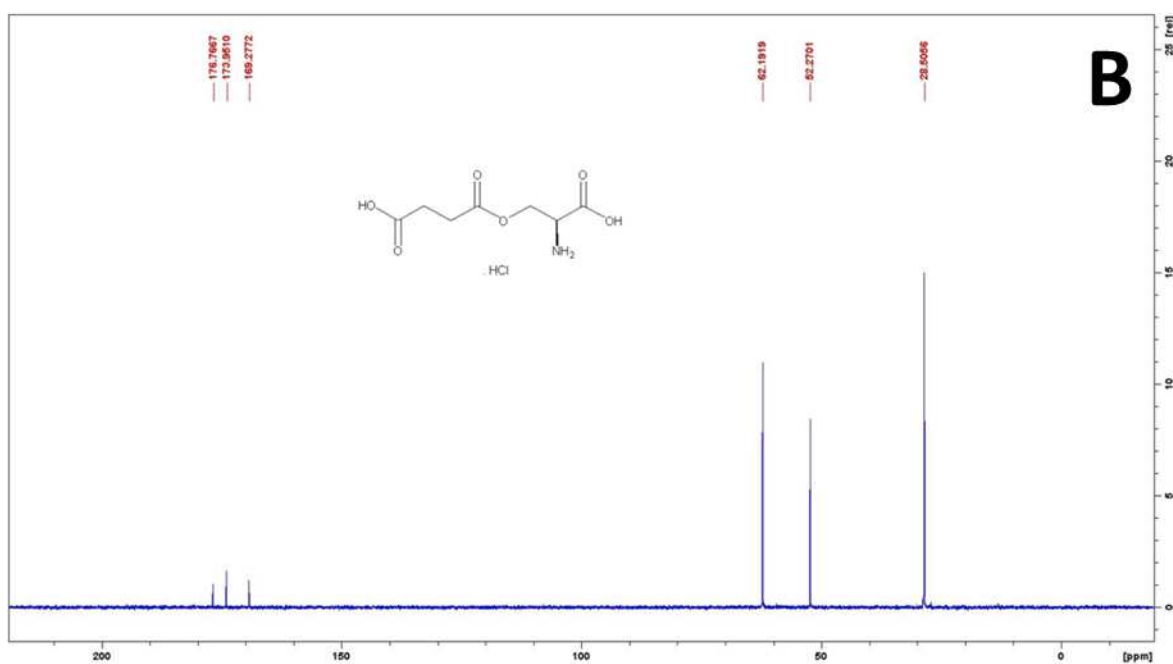
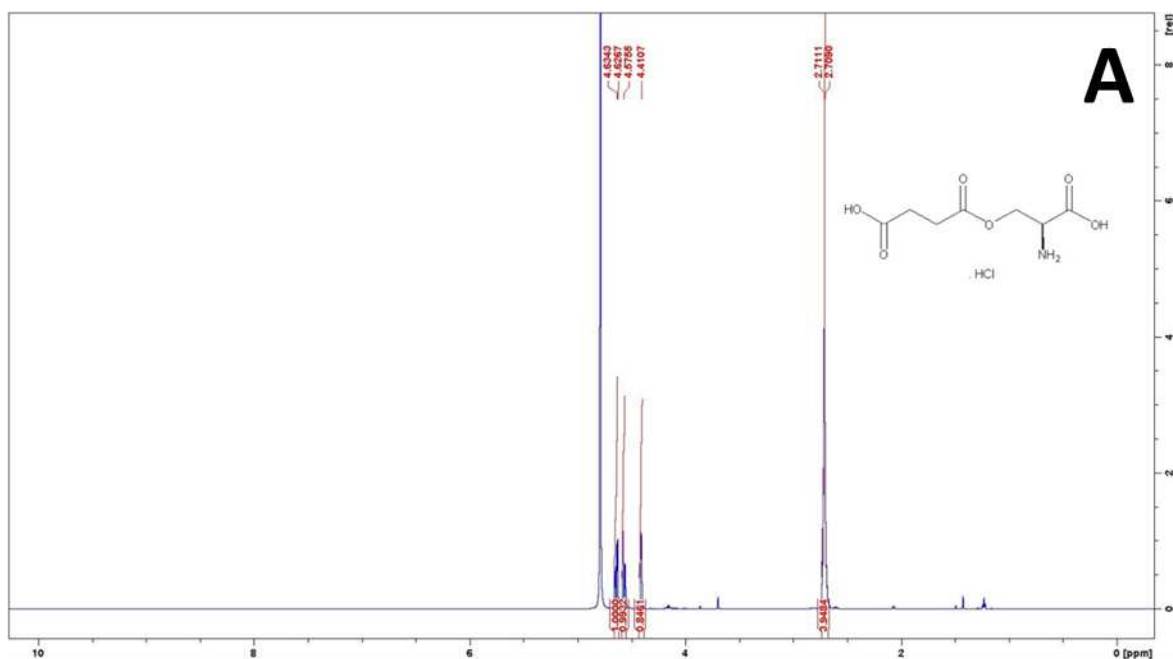
(1) Production de l'insert (gène d'intérêt) : les amorces s'hybrident sur le gène cible. Par PCR on obtient le gène cible sous forme d'ADN double brin. On ne peut pas utiliser ce produit pour faire un clonage LIC puisqu'il faut des extrémités cohésives compatibles avec le vecteur. On utilise donc l'enzyme T4 polymérase avec les propriétés 5'-3' polymérase et 3'-5' exonucléase et un seul désoxyribonucléotide dGTP pour créer des extrémités protrusives.

(2) Le vecteur LIC possède un site de clonage multiple (MCS) contenant le promoteur T7 fusionné au gène cible qui est reconnu par l'ARN polymérase T7 exprimée par la cellule hôte, ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline. L'utilisation de la T4 DNA polymérase, ainsi que l'ajout de dCTP permet de créer deux adaptateurs cohésifs compatibles avec l'insert.

L'hybride plasmide/insert est utilisé tel quel sans l'intervention de ligase *in vitro*. Les liaisons phosphodiester sont mises en place par la ligase bactérienne endogène de la bactérie *E. coli*. Les principaux avantages sont la non utilisation d'enzymes de restriction, un clonage directionnel et la compatibilité avec du clonage à haut débit.

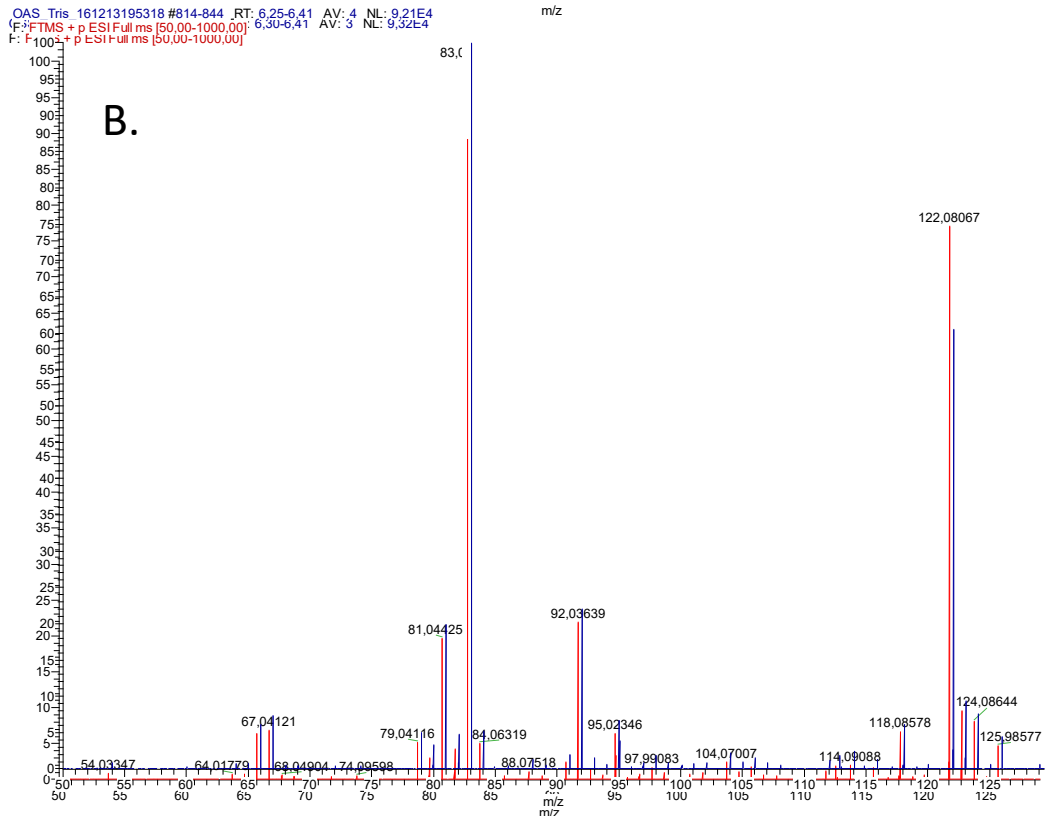
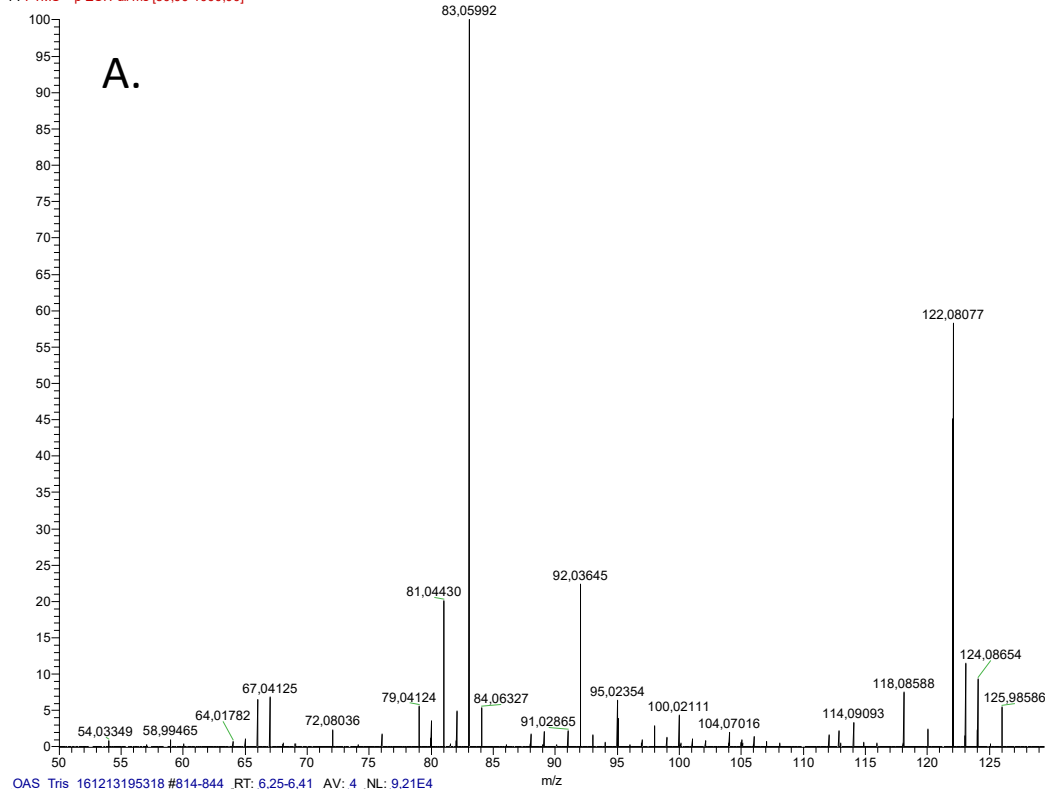


Annexe 4 : Spectres RMN de la *N*-Boc-*O*-succinyl-*L*-sérine. A : spectre RMN-¹H. B : spectre RMN-¹³C. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz), δ = 9.47 (ls, 2H, CO₂H), 5.65 (d, J = 8,2 Hz, 1H, NH), 4,33–4,63 (m, 3H, COCHCH₂O), 2,64–2,67 (m, 4H, HO₂CCH₂CH₂CO), 1,46 (s, 9H, C(CH₃)₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), δ = 177,6, 174,4 and 171,5 (HO₂C and OCOCH₂), 155,4 (NHCOOC(CH₃)₃), 80,8 (C(CH₃)₃), 64,7 (COCHCH₂O), 52,8 (COCHCH₂O), 29,0 and 28,9 (HO₂CCH₂CH₂CO), 28,3 (C(CH₃)₃).

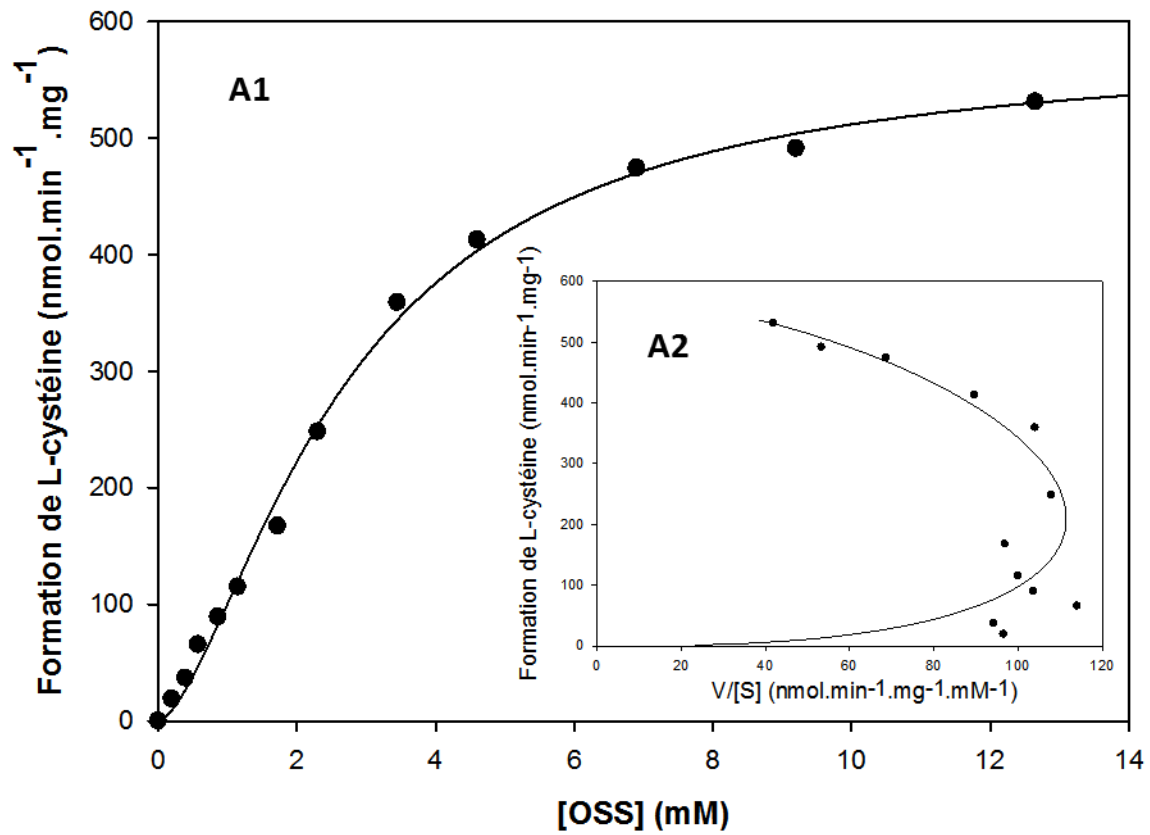


Annexe 5 : Spectres RMN de l'O-succinyl-L-sérine. A : spectre RMN-¹H. B : spectre RMN-¹³C. RMN ¹H (D₂O, 600 MHz), δ = 4,63 and 4,58 (m, 2H, COCHCH₂O), 4,41 (m, 1H, COCHCH₂O), 2,71 (m, 4H, HO₂CCH₂CH₂CO); RMN ¹³C (D₂O, 125 MHz), δ = 176,8, 174,0 and 169,3 (HO₂C and OCOCH₂), 62,2 (COCHCH₂O), 52,3 (COCHCH₂O), 28,5 (HO₂CCH₂CH₂CO).

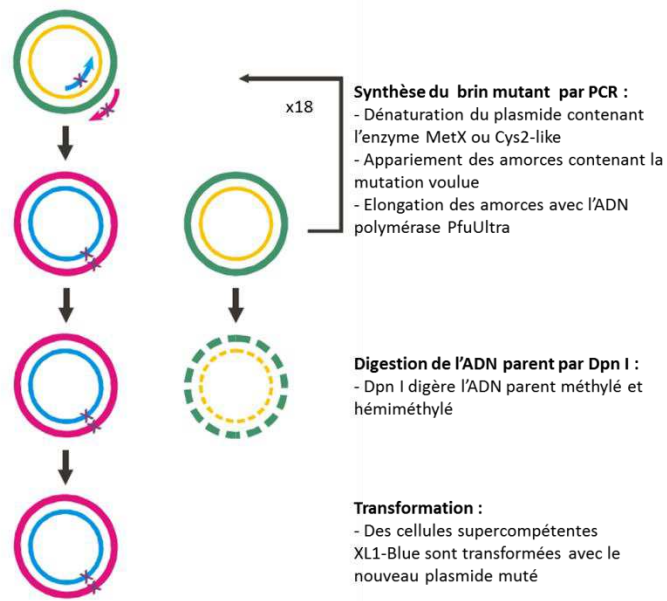
Sdt-Cysteine_161213220501 #810-836 RT: 6,19-6,35 AV: 4 NL: 8,80E4
 F: FTMS + p ESI Full ms [50,00-1000,00]



Annexe 6 : Mise en évidence de la production de L-cystéine à partir d'OSS et de Na₂S via CysK_{pombe}. L'analyse a été faite en mode positif via l'appareil Orbitrap Elite™. A. Spectre de fragmentation MS de l'ion moléculaire [M+H]⁺ (recherche à m/z = 122,027) pour le standard L-cystéine détecté à 6,3 min. B. Superposition des spectres de fragmentation MS de l'ion moléculaire [M+H]⁺ (m/z = 122,027) pour la L-cystéine produite à partir d'OAS (en bleu) et celle produite à partir d'OSS (rouge), détectées toutes deux à 6,3 min.



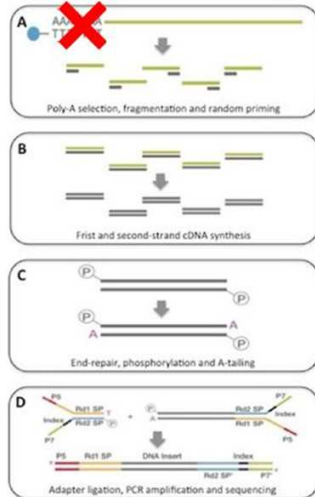
Annexe 7 : Comportement cinétique allostérique de l'enzyme CysK_{ADP1} lors de la transsulfuration de l'OSS. A1, représentation de la vitesse de formation de L-cystéine par mg d'enzyme en fonction de la concentration en OSS chez *A. baylyi* (v versus $[S]$), à l'aide de l'équation de Hill du logiciel SigmaPlot (Systat Software, Inc.). A2, représentation d'Eadie-Hofstee (v versus $v/[S]$), des valeurs présentées en A1.



Annexe 8 : Principe général de la mutagenèse dirigée via le kit QuickChange II d'Agilent Technologies.

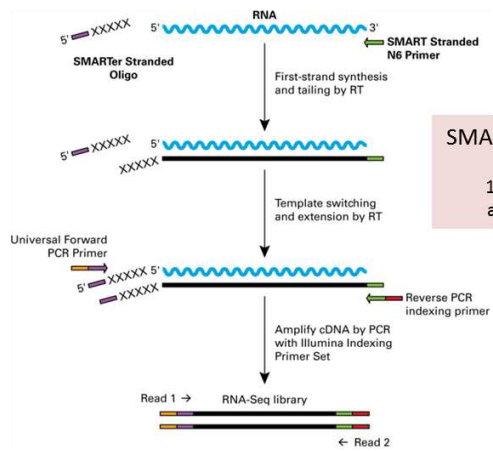
Déplétion des ARNr bactériens (kit Ribo-zero™, epicentre-Illumina)

100 ng ARN depletés rRNA



Truseq stranded
prokaryotes
fgm 8 min
15 cycles PCR
ampure 0,8V

<100 ng ARN depletés rRNA

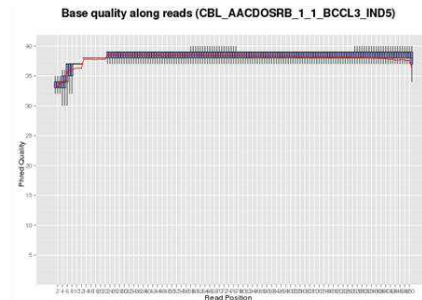


SMARTer stranded
fgm 5 min
18 cycles PCR
ampure 0,8V

Annexe 9 : Protocoles de RNAseq appliqué aux ARNm extraits de procaryotes selon la quantité disponible.

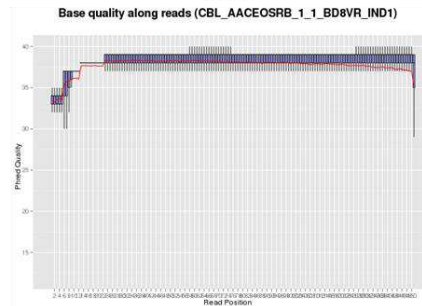
↓ sulfate_pool1 *bwa Version: 0.7.4-r385 dir mRNAseq solexa*

Total read number	4543139	100 %
Nb of unmapped reads	38720	0.85 %
Nb of reads mapped at least once	4504419	99.15 %
Nb of reads mapped on rRNA	920	0.02 %
Nb of reliable reads	4465622	98.29 %
Nb of reads kept on chromosome ACIAD	4465622	98.29 %
Total reads mapped on genomic objects (except rRNA) into chromosome ACIAD	4718520	103.86 %



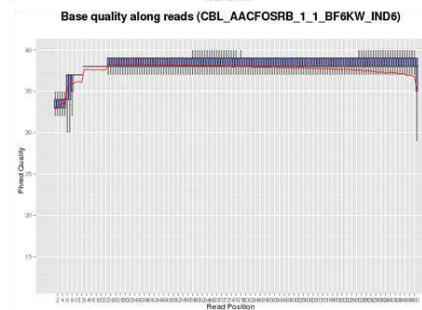
↓ sulfate_pool2 *bwa Version: 0.7.4-r385 dir mRNAseq solexa*

Total read number	3906518	100 %
Nb of unmapped reads	41048	1.05 %
Nb of reads mapped at least once	3865470	98.95 %
Nb of reads mapped on rRNA	3873	0.10 %
Nb of reliable reads	3814649	97.65 %
Nb of reads kept on chromosome ACIAD	3814649	97.65 %
Total reads mapped on genomic objects (except rRNA) into chromosome ACIAD	4046213	103.58 %



↓ sulfate_pool3 *bwa Version: 0.7.4-r385 dir mRNAseq solexa*

Total read number	4043636	100 %
Nb of unmapped reads	42562	1.05 %
Nb of reads mapped at least once	4001074	98.95 %
Nb of reads mapped on rRNA	1480	0.04 %
Nb of reliable reads	3947540	97.62 %
Nb of reads kept on chromosome ACIAD	3947540	97.62 %
Total reads mapped on genomic objects (except rRNA) into chromosome ACIAD	4210635	104.13 %

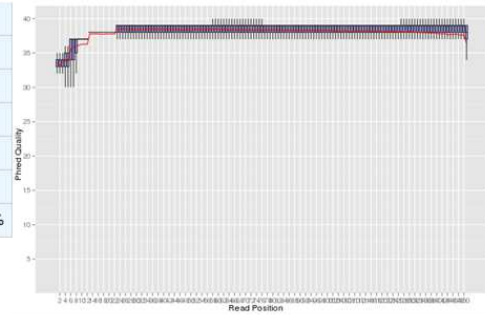


Annexe 10 : Evaluation de la qualité du séquençage et du transcriptome obtenu sur la condition sulfate.

↓ **cysteine_pool1** *bwa Version: 0.7.4-r385 dir mRNAseq solexa*

Total read number	3570973	100 %
Nb of unmapped reads	26491	0.74 %
Nb of reads mapped at least once	3544482	99.26 %
Nb of reads mapped on rRNA	1536	0.04 %
Nb of reliable reads	3520855	98.60 %
Nb of reads kept on chromosome ACIAD	3520855	98.6 %
Total reads mapped on genomic objects (except rRNA) into chromosome ACIAD	3723835	104.28 %

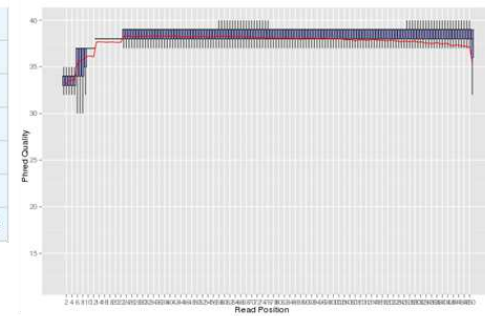
Base quality along reads (CBL_AACJOSRB_1_1_BCCL3_IND2)



↓ **cysteine_pool2** *bwa Version: 0.7.4-r385 dir mRNAseq solexa*

Total read number	3890100	100 %
Nb of unmapped reads	36098	0.93 %
Nb of reads mapped at least once	3854002	99.07 %
Nb of reads mapped on rRNA	1890	0.05 %
Nb of reliable reads	3830415	98.47 %
Nb of reads kept on chromosome ACIAD	3830415	98.47 %
Total reads mapped on genomic objects (except rRNA) into chromosome ACIAD	4035394	103.73 %

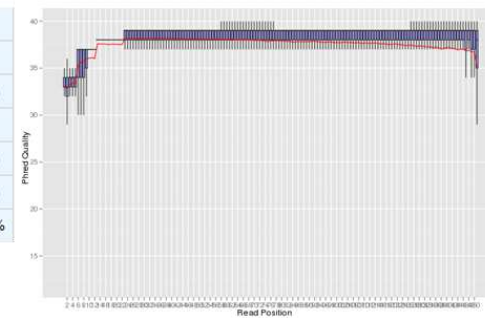
Base quality along reads (CBL_AACLOS RB_1_1_BD8VR_IND4)



↓ **cysteine_pool3** *bwa Version: 0.7.4-r385 dir mRNAseq solexa*

Total read number	3922859	100 %
Nb of unmapped reads	36003	0.92 %
Nb of reads mapped at least once	3886856	99.08 %
Nb of reads mapped on rRNA	8996	0.23 %
Nb of reliable reads	3849123	98.12 %
Nb of reads kept on chromosome ACIAD	3849123	98.12 %
Total reads mapped on genomic objects (except rRNA) into chromosome ACIAD	4084637	104.12 %

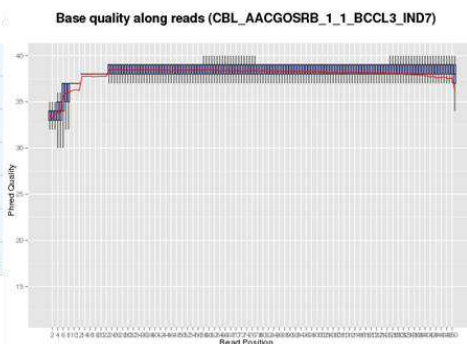
Base quality along reads (CBL_AACKOSRB_1_1_BF6KW_IND3)



Annexe 11 : Evaluation de la qualité du séquençage et du transcriptome obtenu sur la condition cystéine.

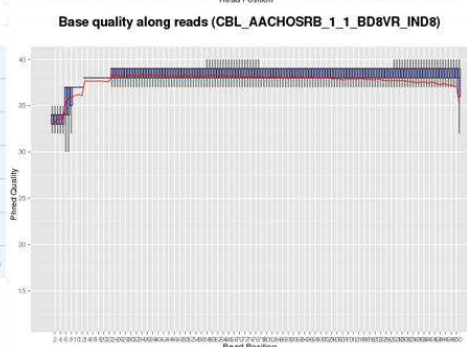
↓ **methionine_pool1** *bwa Version: 0.7.4-r385 dir mRNAseq solexa*

Total read number	4275715	100 %
Nb of unmapped reads	46372	1.08 %
Nb of reads mapped at least once	4229343	98.92 %
Nb of reads mapped on rRNA	1001	0.02 %
Nb of reliable reads	4200638	98.24 %
Nb of reads kept on chromosome ACIAD	4200638	98.24 %
Total reads mapped on genomic objects (except rRNA) into chromosome ACIAD	4367386	102.14 %



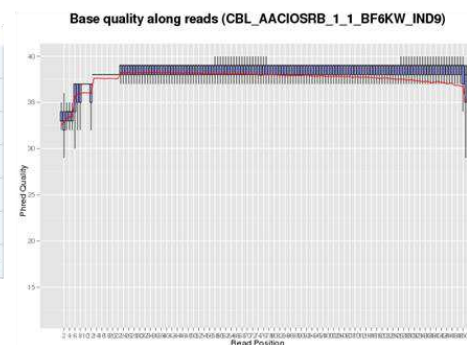
↓ **methionine_pool2** *bwa Version: 0.7.4-r385 dir mRNAseq solexa*

Total read number	4186927	100 %
Nb of unmapped reads	45261	1.08 %
Nb of reads mapped at least once	4141666	98.92 %
Nb of reads mapped on rRNA	1860	0.04 %
Nb of reliable reads	4113106	98.24 %
Nb of reads kept on chromosome ACIAD	4113106	98.24 %
Total reads mapped on genomic objects (except rRNA) into chromosome ACIAD	4293863	102.55 %



↓ **methionine_pool3** *bwa Version: 0.7.4-r385 dir mRNAseq solexa*

Total read number	3251063	100 %
Nb of unmapped reads	41519	1.28 %
Nb of reads mapped at least once	3209544	98.72 %
Nb of reads mapped on rRNA	2573	0.08 %
Nb of reliable reads	3184357	97.95 %
Nb of reads kept on chromosome ACIAD	3184357	97.95 %
Total reads mapped on genomic objects (except rRNA) into chromosome ACIAD	3330887	102.46 %



Annexe 12 : Evaluation de la qualité du séquençage et du transcriptome obtenu sur la condition méthionine.

Label	Name	Product	Methionine				Cysteine			
			baseMean A (sulfate)	baseMeanB (methionine)	log2Fold Change	padj	baseMean A (Sulfates)	baseMeanB (L-cystéine)	log2Fold Change	padj
ACIAD0045	dsbA	thiol:disulfide interchange protein, periplasmic, alkali-inducible	1881	1271	-0,57	0,38	2058	2412	0,23	0,77
ACIAD0065	fkfB	FKBP-type 22KD peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase)	822	767	-0,1	0,97	899	1077	0,26	0,72
ACIAD0066	fkfA	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (rotamase)	1037	850	-0,29	0,79	1134	1284	0,18	0,81
ACIAD0193	-	glutathione peroxidase	904	948	6,95E-02	0,99	988	1056	9,58E-02	0,95
ACIAD0265	dsbC	thiol:disulfide interchange protein	1120	906	-0,31	0,75	1224	805	-0,6	0,27
ACIAD0316	htpG	chaperone Hsp90, heat shock protein C 62,5	9661	6046	-0,68	0,23	1,06E+04	6833	-0,63	0,13
ACIAD0407	hslO	heat shock protein Hsp33	1543	1196	-0,37	0,66	1689	1485	-0,19	0,77
ACIAD0436	ahpC	alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit, thioredoxin-like, detoxification of hydroperoxides	204	464	1,18	8,75E-03	223	938	2,07	5,30E-08
ACIAD0451	katA	catalase (hydroperoxidase II)	2431	5806	1,26	2,26E-03	2661	5789	1,12	3,54E-03
ACIAD0484	lpxP	Lipid A biosynthesis (KDO) 2-(lauroyl)-lipid IVA acyltransferase (Heat shock protein B)	402	314	-0,36	0,73	439	365	-0,27	0,71
ACIAD0510	msrA	peptide methionine sulfoxide reductase (Protein- methionine-S-oxide reductase) (Peptide Met(O) reductase)	1042	755	-0,46	0,56	1139	1500	0,4	0,53
ACIAD0511	-	conserved hypothetical protein; putative heat shock protein HslJ	70	29	-1,29	3,22E-02	77	52	-0,55	0,46
ACIAD0534	clpP	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (Endopeptidase Clp) (Caseinolytic protease) (Protease T1) (Heat shock protein F21,5)	3133	3192	2,66E-02	1	3428	4111	0,26	0,71
ACIAD0535	clpX	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit	7569	7056	-0,1	0,96	8281	8646	6,21E-02	0,98
ACIAD0706	ppiC	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase precursor (PPIase) (Rotamase)	104	77	-0,44	0,63	114	142	0,32	0,75
ACIAD0713	-	putative thiol:disulphide interchange protein (DsbC-like)	662	819	0,31	0,74	724	796	0,14	0,87
ACIAD0890	trxB	thioredoxin reductase 1	838	821	-2,87E-02	1	916	1123	0,29	0,66
ACIAD0910	fur	negative regulator of ferric iron uptake	1597	1213	-0,4	0,68	1745	1869	9,93E-02	0,89
ACIAD1070	sodM	superoxide dismutase [Mn]	1301	1807	0,47	0,48	1422	646	-1,14	1,00E-02
ACIAD1115	lon	DNA-binding ATP-dependent protease La	6684	5889	-0,18	0,85	7317	9094	0,31	0,68
ACIAD1205	dps	stress response DNA-binding protein, starvation induced resistance to H2O2, ferritin-like	675	820	0,28	0,82	739	583	-0,34	0,6
ACIAD1234	ahpF	alkyl hydroperoxide reductase subunit, FAD/NAD(P)-binding, detoxification of hydroperoxides	164	263	0,68	0,3	179	466	1,38	9,90E-04
ACIAD1265	clpB	ATP-dependent protease, Hsp 100, part of multi-chaperone system with DnaK, DnaJ, and GrpE	6122	5988	-3,19E-02	0,96	6707	5751	-0,22	0,64
ACIAD1346	sodB	superoxide dismutase [Fe]	8832	1,82E+04	1,04	1,31E-02	9664	1,06E+04	0,13	0,89
ACIAD1362	clpS	substrate modulator for ClpAP, directs protease activity towards aggregated proteins	932	947	2,23E-02	1	1019	1235	0,28	0,69
ACIAD1363	clpA	ATP-binding protease component	2646	3631	0,46	0,58	2897	5686	0,97	2,23E-02
ACIAD1386	hslR	heat shock protein 15	661	580	-0,19	0,83	723	449	-0,69	0,15
ACIAD1393	-	conserved hypothetical protein; putative iron-dependent peroxidase	385	461	0,26	0,82	422	658	0,64	0,25
ACIAD1399	hscA	heat shock protein (Hsp); chaperon involved in the Fe/S cluster biosynthesis	1222	888	-0,46	0,61	1334	1500	0,17	0,81
ACIAD1409	ppiD	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase precursor (PPIase) (Rotamase)	3081	2122	-0,54	0,48	3366	2875	-0,23	0,76
ACIAD1921	ppiB	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase precursor (PPIase) (Rotamase)	2288	1677	-0,45	0,59	2502	3112	0,31	0,64
ACIAD2072	sodM	superoxide dismutase [Mn]	279	134	-1,06	7,05E-02	304	39	-2,96	1,02E-11
ACIAD2085	gpo	glutathione peroxidase	2310	2988	0,37	0,69	2528	3052	0,27	0,7
ACIAD2086	msrB	peptide methionine sulfoxide reductase	1993	2578	0,37	0,69	2182	3301	0,6	0,27
ACIAD2103	ahpC	alkyl hydroperoxide reductase, C22 subunit, thioredoxin-like (detoxification of hydroperoxides)	3709	6550	0,82	0,12	4057	7434	0,87	3,99E-02
ACIAD2250	ahpF	alkyl hydroperoxide reductase subunit, FAD/NAD(P)-binding, detoxification of hydroperoxides	188	351	0,9	9,53E-02	205	493	1,27	2,71E-03
ACIAD2362	kdsB	3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase	351	276	-0,34	0,77	384	390	2,54E-02	0,99
ACIAD2372	surA	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	3307	2859	-0,21	0,87	3616	3581	-1,42E-02	1
ACIAD2413	hscC	chaperone protein	851	1495	0,81	0,13	931	713	-0,38	0,55
ACIAD2833	htpX	heat shock protein	4187	6602	0,66	0,23	4579	8631	0,91	1,73E-02
ACIAD2838	groEL	chaperone Hsp60, peptide-dependent ATPase, heat shock protein	2,94E+04	2,31E+04	-0,35	0,67	3,22E+04	2,55E+04	-0,34	0,46
ACIAD2839	groES	chaperone Hsp10, affects cell division	3627	2866	-0,34	0,73	3968	3782	-6,92E-02	0,93
ACIAD3022	-	putative organic hydroperoxide resistance transcriptional regulator (ohrR)	114	60	-0,93	0,15	125	69	-0,84	0,15
ACIAD3023	ohr	organic hydroperoxide resistance protein	552	851	0,62	0,31	603	391	-0,63	0,27
ACIAD3037	trxA	thioredoxin	1477	1524	4,53E-02	1	1615	2158	0,42	0,51
ACIAD3053	ibp	small heat-shock protein	176	184	6,63E-02	1	193	199	4,45E-02	0,96
ACIAD3082	soxR	transcriptional activator for superoxide response, contains iron-sulfur center for redox-sensing (MerR family)	22	20	-0,16	0,92	24	24	8,57E-03	0,99
ACIAD3121	grx	glutaredoxin	3110	2246	-0,47	0,51	3401	3060	-0,15	0,82
ACIAD3140	thi3	thioredoxin C-3	151	133	-0,18	0,89	165	203	0,3	0,76
ACIAD3532	dsbD	thiol:disulfide interchange protein precursor	889	1054	0,25	0,83	973	1064	0,13	0,9
ACIAD3548	dsbB	disulfide bond formation protein (Disulfide oxidoreductase)	558	397	-0,49	0,53	611	483	-0,34	0,58
ACIAD3621	dnaJ	heat shock protein (Hsp40), co-chaperone with DnaK	862	1141	0,4	0,62	943	1221	0,37	0,56

Annexe 13 : Expression de 55 protéines de stress dans les 3 conditions testées. Les nuances de vert pour le padj représentent le degré de confiance. Les protéines sur- ou sous-exprimées dans une condition sont indiquées dans la colonne Log2FoldChange en vert ou en rouge, respectivement. L'absence de couleur traduit l'absence de changement d'expression suite à un changement de condition.

Label	Name	Product	Methionine				Cysteine			
			baseMeanA (sulfate)	baseMeanB (methionine)	log2Fold Change	padj	baseMeanA (Sulfates)	baseMeanB (L-cystéine)	log2Fold Change	padj
ACIAD0264	hom	homoserine dehydrogenase	3568	4209	0,24	0,77	3901	4680	0,26	0,64
ACIAD0479	asd	aspartate-semialdehyde dehydrogenase, NAD(P)-binding	2508	1725	-0,54	0,48	2741	2755	7,42E-03	1
ACIAD0528	metW	methionine biosynthesis protein	1044	1192	0,19	0,86	1141	1600	0,49	0,39
ACIAD0529	metX	homoserine O-acetyltransferase	961	851	-0,18	0,9	1051	1162	0,14	0,87
ACIAD0768	metG	methionyl-tRNA synthetase	2134	1695	-0,33	0,77	2332	2088	-0,16	0,89
ACIAD0799	cysJ	bifunctional protein, Includes: sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component; iron-uptake factor methionine synthase (B12-dependent homocysteine-N5-methyltetrahydrofolate transmethylase, repressor of metE and metF)	1585	1255	-0,34	0,8	1730	240	-2,85	#####
ACIAD1045	metH	sulfate adenyltransferase subunit 2 (Sulfate adenylate transferase) (SAT) (ATP-sulfurylase small subunit)	1351	1449	0,1	0,93	1476	1525	4,73E-02	0,94
ACIAD1072	cysD	ATP-sulfurylase, subunit 1	2805	2667	-7,31E-02	1	3067	2008	-0,61	0,24
ACIAD1073	cysN	aspartate kinase	4697	4186	-0,17	0,92	5135	3090	-0,73	0,11
ACIAD1252	lysC	PAPS (adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate) 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase, converts PAPS to APS	7198	5293	-0,44	0,61	7868	6851	-0,2	0,79
ACIAD1387	cysQ	cysteine-tRNA synthetase	193	197	3,10E-02	1	211	231	0,13	0,9
ACIAD1481	cysS	serine acetyltransferase	1532	1130	-0,44	0,6	1674	1962	0,23	0,74
ACIAD1584	srpH	subunit of cysteine synthase A and O-acetylserine sulfhydrylase A, PLP-dependent enzyme	354	1,82E+04	5,69	#####	388	82	-2,24	#####
ACIAD1662	cysK	serine acetyltransferase	1335	1432	0,1	0,97	1460	1967	0,43	0,48
ACIAD1763	srpH	methionine adenosyltransferase	1075	1253	0,22	0,84	1176	1787	0,6	0,25
ACIAD2037	metK	D-methionine transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	1910	1511	-0,34	0,77	2087	1768	-0,24	0,8
ACIAD2068	metN	D- and L-methionine transport protein (ABC superfamily, atp_bind)	20	5658	8,18	#####	21	17	-0,32	0,78
ACIAD2069	metN	D- and L-methionine transport protein (ABC superfamily, membrane)	21	5034	7,94	#####	22	24	7,33E-02	0,98
ACIAD2070	metI	serine acetyltransferase	13	3513	8,1	#####	14	25	0,81	0,39
ACIAD2091	cysE	S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase	418	264	-0,66	0,36	456	402	-0,18	0,87
ACIAD2282	sahH	5,10-methylenetetrahydrofolate reductase	3403	1752	-0,96	#####	3724	7792	1,07	#####
ACIAD2283	metF	transcriptional regulator	1159	653	-0,83	0,12	1267	2395	0,92	#####
ACIAD2314	metZ	sulfate permease A protein, chromate resistance (ABC superfamily, atp_bind)	1019	822	-0,31	0,77	1114	1389	0,32	0,61
ACIAD2384	metR	3-phosphoserine aminotransferase	887	396	-1,17	#####	971	506	-0,94	#####
ACIAD2591	cysP	multifunctional protein [Includes: Uroporphyrin-III C-methyltransferase (Urogen III methylase) (SUMT) (Uroporphyrinogen III methylase) (UROM); Precorrin-2 oxidase; Ferrochelatase]	482	1,81E+04	5,23	#####	528	154	-1,78	#####
ACIAD2594	cysT	Sulfite reductase (NADPH) hemoprotein beta-component	95	2476	4,7	#####	104	61	-0,78	0,19
ACIAD2595	cysW	cysteine synthase B (O-acetylserine sulfhydrylase B)	148	3295	4,48	#####	162	105	-0,62	0,32
ACIAD2596	cysA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	236	4718	4,32	#####	258	171	-0,6	0,32
ACIAD2597	cbI	homocysteine synthase	230	4258	4,21	#####	251	184	-0,45	0,51
ACIAD2647	serC	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate- homocysteine methyltransferase	1884	1583	-0,25	0,85	2060	2252	0,13	0,84
ACIAD2934	cysG	phosphoserine phosphatase	415	474	0,19	0,86	454	543	0,26	0,7
ACIAD2982	cysI	Sulfite reductase (NADPH) hemoprotein beta-component	2555	1832	-0,48	0,65	2791	353	-2,98	#####
ACIAD3071	cysM	cysteine synthase B (O-acetylserine sulfhydrylase B)	923	895	-4,37E-02	1	1008	987	-3,07E-02	1
ACIAD3302	serA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	3471	2999	-0,21	0,89	3795	3846	1,93E-02	1
ACIAD3382	metY	homocysteine synthase	260	9127	5,13	#####	285	756	1,41	#####
ACIAD3523	metE	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate- homocysteine methyltransferase	2,57E+04	1268	-4,34	#####	2,82E+04	5,31E+04	0,91	#####
ACIAD3567	serB	phosphoserine phosphatase	577	541	-9,08E-02	1	630	694	0,14	0,83

Annexe 14 : Expression des 37 gènes impliqués dans la biosynthèse de la L-méthionine.

Label	Name	Product	Methionine				Cysteine			
			baseMeanA (sulfate)	baseMeanB (methionine)	log2Fold Change	padj	baseMeanA (Sulfates)	baseMeanB (L-cysteine)	log2Fold Change	padj
ACIAD0034	ssuB	alkanesulfonate transport protein (ABC superfamily, atp_bind)	24	4489	7,52	3,99E-62	27	17	-0,64	0,49
ACIAD0035	ssuC	alkanesulfonate transport protein (ABC superfamily, membrane)	37	6117	8,46	6,62E-72	39	19	-1,86E-02	1
ACIAD0036	ssuD	FMN(H2)-dependent alkanesulfonate monooxygenase	27	1,14E+04	9,74	1,64E-77	29	19	-0,65	0,47
ACIAD0037	ssuA	alkanesulfonate transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	24	1,09E+04	8,82	4,89E-77	26	12	-1,13	0,11
ACIAD0038	ssuA	alkanesulfonate transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	16	8752	9,1	1,22E-79	17	8,05	-1,12	0,19
ACIAD0427	-	putative acyl-CoA dehydrogenase	49	5,10E+04	10	2,62E-114	54	55	4,26E-02	1
ACIAD0428	-	putative acyl-CoA dehydrogenase	64	4,30E+04	9,4	1,64E-102	69	70	1,06E-02	1
ACIAD0647	-	putative antioxidant protein	804	1,57E+04	4,29	5,79E-30	881	794	-0,15	0,8
ACIAD1191	-	putative transport protein	357	3342	3,23	3,88E-18	391	335	-0,22	0,78
ACIAD1503	-	putative desulfurization enzyme B (dibenzothiophene)	4,78	2027	8,73	1,99E-67	5,22	3,6	-0,54	0,72
ACIAD1504	-	putative aldolase class II	13	1800	7,07	1,85E-53	15	11	-0,43	0,69
ACIAD1505	-	putative Dibenzothiophene desulfurization enzyme	20	1434	2,28	1,94E-44	22	16	-0,4	0,68
ACIAD1506	-	putative dipeptide transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	39	2616	6,06	2,57E-46	43	33	-0,39	0,69
ACIAD1507	-	putative dipeptide transport protein (ABC superfamily, membrane)	22	1385	5,95	1,70E-42	25	19	-0,34	0,78
ACIAD1508	-	putative dipeptide transporter (ABC superfamily, ATP_bind)	16	661	5,41	8,92E-34	17	14	-0,33	0,82
ACIAD1509	-	putative acyl-CoA dehydrogenase, putative desulfurization enzyme C (dibenzothiophene)	43	1965	5,5	8,04E-40	47	44	-0,12	0,95
ACIAD1510	-	putative dibenzothiophene desulfurization enzyme B	95	2014	4,41	6,26E-29	104	76	-0,46	0,57
ACIAD1512	-	putative transport protein (ABC superfamily, atp_bind and membrane)	3,07	523	7,41	4,99E-43	3,36	2,91	-0,62	0,96
ACIAD1514	-	putative transport protein (ABC superfamily, atp_bind and membrane)	12	144	3,55	3,01E-13	13	8,94	-0,58	0,61
ACIAD1515	-	putative ferric enterobactin receptor protein	19	178	3,26	5,66E-12	20	17	-0,28	0,79
ACIAD1516	-	conserved hypothetical protein; putative signal peptide	16	1477	6,68	8,12E-48	18	14	-0,34	0,8
ACIAD1517	-	putative sulfonate monooxygenase	49	1291	4,72	1,26E-30	54	44	-0,27	0,76
ACIAD1518	-	putative sigma-54 dependent transcriptional regulator	19	488	4,71	3,81E-26	20	22	9,02E-02	0,98
ACIAD1519	-	Sec-independent protein secretion pathway, component C	23	3833	7,35	3,85E-60	26	23	-0,14	0,89
ACIAD1520	tatC	Sec-independent protein secretion pathway, component C	11	888	6,38	1,31E-42	12	11	-5,36E-02	0,93
ACIAD1521	tatB	Sec-independent protein secretion pathway, component B	14	1855	7,06	1,95E-54	15	20	0,38	0,73
ACIAD1522	tatA	Sec-independent protein secretion pathway, translocase protein	4,84	421	6,45	2,27E-36	5,3	7,42	0,49	0,71
ACIAD1523	-	putative permease protein (ABC superfamily, membrane)	19	279	3,84	4,27E-17	21	24	0,18	0,92
ACIAD1524	-	putative permease protein (ABC superfamily, membrane)	13	215	4,07	5,84E-18	14	6,27	-1,15	0,23
ACIAD1525	-	putative binding protein (ABC superfamily, peri_bind)	6,05	157	4,69	1,08E-19	6,59	4,41	-0,58	0,65
ACIAD1526	-	putative FMN(H2)-dependent methane/alkanesulfonate monooxygenase	5,7	182	5	1,60E-21	6,21	1,33	-2,22	2,02E-02
ACIAD1527	-	putative tonB-like protein	3,02	333	6,78	8,28E-35	3,3	1,3	-1,35	0,34
ACIAD1528	-	putative biopolymer transport protein (ExbB-like)	3,81	860	7,82	1,40E-51	4,16	3,3	-0,33	0,9
ACIAD1529	-	putative biopolymer transport protein (ExbD-like)	11	1176	6,8	9,63E-49	12	8,83	-0,39	0,79
ACIAD1530	-	putative oligopeptide binding protein (ABC superfamily, peri_bind)(OppA)	13	685	5,71	5,87E-36	14	18	0,35	0,78
ACIAD1531	-	hypothetical protein; putative outer membrane receptor protein	16	243	3,89	4,27E-17	18	11	-0,75	0,44
ACIAD1533	-	putative tonB-dependent receptor protein (outer membrane salicin receptor)	17	388	4,47	1,41E-23	19	16	-0,29	0,82
ACIAD1534	-	putative FMN(H2)-dependent monooxygenase (sulfonate)	29	1359	5,53	1,90E-38	32	27	-0,25	0,82
ACIAD1535	-	putative cysteine desulfurase 1 (Csd)	67	888	3,72	2,09E-20	73	49	-0,57	0,45
ACIAD1582	-	major membrane protein 1 (MMP-1) (35 kDa antigen)	559	2,31E+04	5,37	3,36E-44	611	275	-1,15	9,68E-03
ACIAD1583	srpL	serine acetyltransferase	387	1,88E+04	5,6	2,70E-45	424	204	-1,05	1,87E-02
ACIAD1584	srpH	conserved hypothetical protein; putative rhodanese-related sulfurtransferase	354	1,82E+04	5,69	1,11E-45	388	82	-2,24	5,49E-08
ACIAD1585	-	sulfate ester permease protein (ABC superfamily, membrane)	124	6476	5,71	3,37E-43	136	27	-2,31	6,63E-07
ACIAD1586	atsB	sulfate ester transporter (ABC superfamily, ATP_bind)	15	1130	6,19	1,31E-43	17	9,75	-0,79	0,41
ACIAD1587	atsC	putative tonB-like protein	6,45	348	5,75	3,61E-30	7,05	3,7	-0,93	0,35
ACIAD1588	-	putative biopolymer transport protein (ExbB-like)	14	991	6,12	7,13E-42	16	16	5,56E-02	0,99
ACIAD1589	-	putative biopolymer transport protein (ExbD-like)	27	1019	5,25	1,36E-34	29	25	-0,22	0,84
ACIAD1590	-	putative transcriptional regulator	23	733	5,02	1,17E-30	25	26	6,93E-02	1
ACIAD1591	-	putative alkyisulfatase (AtsK-like)	11	1694	7,23	3,42E-55	12	12	6,30E-03	1
ACIAD1592	-	sulfate ester binding protein (ABC superfamily, peri_bind)	21,9	162	6,68	4,49E-26	23,4	8,04	-0,38	0,85
ACIAD1593	atsR	putative TonB-dependent receptor protein	7,23	216	4,9	9,18E-23	7,88	5,36	-0,56	0,66
ACIAD1594	-	nitrilotriacetate monooxygenase component A (NTA)	21	386	4,17	4,10E-21	23	13	-0,83	0,37
ACIAD1595	ntaA	monooxygenase component A) (NTA-MO A)	15	184	3,63	1,69E-14	16	11	-0,63	0,59
ACIAD1596	-	putative oxidoreductase	19	139	2,9	1,71E-09	20	19	-0,11	0,93
ACIAD1597	-	putative TonB-dependent receptor	18	623	5,15	9,56E-31	19	21	0,1	0,98
ACIAD1598	atsA	arylsulfatase (Aryl-sulfate sulphohydrolase)	15	1893	7	4,59E-53	16	9,25	-0,81	0,39
ACIAD1599	-	putative transcriptional regulator	18	3373	7,53	2,14E-61	20	19	-5,14E-02	0,98
ACIAD1600	-	putative alkyisulfatase (AtsK)	5,49	1508	8,1	1,17E-59	6	3,69	-0,7	0,55
ACIAD1601	atsR	sulfate ester binding protein (ABC superfamily, peri_bind)	9,26	852	6,52	3,33E-43	10	5,17	-0,97	0,35
ACIAD1935	-	putative sigma-54 dependent transcriptional regulator	33	5449	7,39	2,14E-61	36	33	-9,80E-02	0,92
ACIAD1936	-	conserved hypothetical protein; putative signal peptide	14	3570	7,97	8,68E-65	16	13	-0,28	0,78
ACIAD1937	braG	branched-chain amino acid transport protein (ABC superfamily, ATP_bind)	65	8236	6,98	4,09E-58	71	56	-0,34	0,71
ACIAD1938	-	conserved hypothetical protein; putative membrane protein	92	1,28E+04	7,11	1,90E-61	101	80	-0,33	0,69
ACIAD1939	braE	branched-chain amino acid transport protein (ABC superfamily, membrane)	19	3359	7,47	3,71E-61	21	17	-0,26	0,85
ACIAD1940	-	putative branched-chain amino acid permease protein (ABC superfamily, membrane)	19	3380	7,48	1,50E-61	21	12	-0,77	0,45
ACIAD1941	braF	branched-chain amino acid transport protein (ABC superfamily, atp_bind)	7,67	2618	8,41	8,32E-67	8,37	7,96	-7,32E-02	1
ACIAD1942	-	putative long-chain-fatty-acid-CoA ligase-related protein	2,76	3775	10	6,78E-81	3,02	5,57	0,88	0,49
ACIAD2064	-	putative long-chain-fatty-acid-CoA dehydrogenase	10	1,23E+04	10	8,15E-92	11	9,34	-0,25	0,86
ACIAD2065	-	putative acyl-CoA dehydrogenase	13	1,18E+04	9,87	1,13E-87	14	18	0,4	0,73
ACIAD2066	-	putative monooxygenase (DszA-like)	19	8857	8,84	4,89E-77	21	20	-9,20E-02	0,93
ACIAD2068	metQ	D- and L-methionine transport protein (ABC superfamily, atp_bind)	20	5658	8,18	2,21E-68	21	17	-0,32	0,78
ACIAD2069	metN	D- and L-methionine transport protein (ABC superfamily, membrane)	21	5034	7,94	2,30E-66	22	24	7,33E-02	0,98
ACIAD2070	metI	D- and L-methionine transport protein (ABC superfamily, membrane)	13	3513	8,1	2,48E-66	14	25	0,81	0,39
ACIAD2535	-	putative transporter (MFS superfamily) putative coenzyme F420-dependent N5,N10-methylene tetrahydromethanopterin reductase and related flavin-dependent oxidoreductase	27	8090	8,24	4,10E-71	29	35	0,26	0,84
ACIAD2536	-	putative acyl-CoA dehydrogenase	33	8593	8	2,21E-68	37	29	-0,36	0,67
ACIAD2537	-	putative acyl-CoA dehydrogenase	56	1,10E+04	7,62	2,80E-66	61	48	-0,35	0,65
ACIAD2591	cysP	sulfate transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	482	1,81E+04	5,23	1,83E-41	528	154	-1,78	8,11E-06
ACIAD2592	-	conserved hypothetical protein; putative esterase of the alpha/beta hydrolase fold	143	5148	5,17	1,27E-37	156	56	-1,47	1,81E-03
ACIAD2594	cysT	sulfate transport protein (ABC superfamily, membrane)	95	2476	4,7	3,15E-32	104	61	-0,78	0,19
ACIAD2595	cysW	sulfate transporter (ABC superfamily, membrane)	148	3295	4,48	1,61E-30	162	105	-0,62	0,32
ACIAD2596	cysA	sulfate permease A protein, chromate resistance (ABC superfamily, atp_bind)	236	4718	4,32	2,61E-29	258	171	-0,6	0,32
ACIAD2597	cbI	transcriptional regulator cysteine biosynthesis (LysR family)	230	4258	4,21	6,48E-28	251	184	-0,45	0,51
ACIAD2980	-	conserved hypothetical protein; putative amino acid efflux transmembrane protein	14	2462	7,43	2,03E-58	16	4337	8,12	1,09E-67
ACIAD3369	sbp	sulfate transport protein (ABC superfamily, peri_bind)	285	2,02E+04	6,15	2,73E-52	312	222	-0,49	0,38
ACIAD3382	metY	homocysteine synthase	260	9127	5,13	6,80E-39	285	756	1,41	3,79E-04
ACIAD3392	-	putative long-chain fatty acid transport protein	29	199	6,12	1,14E-45	31	16	-0,97	0,19
ACIAD3470	msuE	NADH-dependent FMN reductase	15	3,28E+04	11	1,31E-115	16	9,55	-0,74	0,45
ACIAD3471	-	putative sulfonate monooxygenase (MsuD)	27	4,16E+04	11	2,62E-114	30	24	-0,35	0,7
ACIAD3474	-	putative FMN(H2)-dependent monooxygenase	36	1433	5,3	3,62E-37	40	62	0,63	0,42
ACIAD3520	-	hypothetical protein; putative signal peptide	97	876	3,18	1,68E-17	106	111	7,44E-02	0,9

Annexe 15 : Liste des 90 gènes surexprimés (log fold change $\geq 2,5$) en présence de L-méthionine vs sulfate. À titre comparatif, l'expression en condition L-cystéine vs sulfate est également présentée.

Label	Name	Product	Méthionine				Cystéine				Cystéine vs Méthionine			
			baseMeanA (sulfate)	baseMeanB (methionine)	log2 FoldChange	padj	baseMeanA (Sulfates)	baseMeanB (L-cystéine)	log2 FoldChange	padj	baseMeanA (methionine)	baseMeanB (L-cystéine)	log2 FoldChange	padj
ACIAD0040	-	conserved hypothetical protein; putative signal peptide APC family, D-serine/D-alanine/glycine transport protein	361	108	-1,74	3,9E-05	393	207	-0,93	5,0E-02	110	188	0,77	2,4E-02
ACIAD0118	cycA	citrate-proton symporter (Citrate transporter) (Citrate carrier protein) (Citrate utilization determinant) (Citrate utilization protein A)	283	79	-1,85	4,8E-05	309	246	-0,33	6,8E-01	80	224	1,48	3,6E-06
ACIAD0395	citA	putative ferric siderophore receptor protein	171	46	-1,88	6,3E-05	186	116	-0,68	2,2E-01	47	105	1,16	1,5E-03
ACIAD0532	-	putative permease (MFS superfamily)	2891	978	-1,56	2,5E-04	3153	78	-5,33	4,3E-39	1000	71	-3,81	6,9E-43
ACIAD1006	-	putative ferric siderophore receptor protein	194	36	-2,42	2,2E-07	212	33	-2,71	2,0E-09	37	30	-0,33	5,3E-01
ACIAD1240	-	putative dihydroorotase	2963	897	-1,72	1,7E-05	3231	104	-4,95	1,5E-35	917	95	-3,27	5,7E-33
ACIAD1419	-	conserved hypothetical protein; putative carbonate dehydratase	1726	336	-2,36	7,6E-11	1892	1,01E+04	2,42	1,3E-12	342	9209	4,75	5,1E-85
ACIAD1420	-	putative ferrichrome-iron receptor protein	1021	190	-2,43	8,5E-11	1118	6005	2,42	8,5E-12	194	5458	4,82	9,5E-85
ACIAD1460	-	transporter, sodium-dicarboxylate symporter family	501	160	-1,64	1,9E-04	548	4320	2,98	6,0E-17	163	3921	4,59	3,1E-75
ACIAD1866	ssIT	putative acyltransferase	834	205	-2,02	3,9E-07	910	266	-1,77	7,6E-06	209	242	0,21	6,5E-01
ACIAD2050	-	putative multidrug resistance pump	183	61	-1,58	1,2E-03	200	61	-1,7	2,2E-04	62	56	-0,16	8,1E-01
ACIAD2325	-	hypothetical protein; putative siderophore-interacting protein	2084	617	-1,76	1,4E-05	2271	47	-5,59	1,4E-40	631	43	-3,88	1,2E-37
ACIAD2761	fbqQ	putative transport protein (MFS superfamily)	994	80	-3,63	3,2E-19	1088	66	-4,04	5,4E-23	82	60	-0,44	3,5E-01
ACIAD2762	fbpP	putative ferric siderophore receptor protein	959	51	-4,23	4,2E-24	1050	45	-4,54	1,4E-27	52	41	-0,35	4,9E-01
ACIAD2763	fbpO	putative thioesterase	599	25	-4,57	6,6E-25	655	19	-5,08	5,0E-30	26	18	-0,55	3,3E-01
ACIAD2764	fbpN	putative non-ribosomal peptide synthetase with condensation, AMP-binding and phosphopantetheine-binding domains	2531	47	-5,74	1,5E-41	2769	30	-6,52	2,7E-49	48	27	-0,82	7,1E-02
ACIAD2765	fbpM	non-ribosomal peptide synthetase	139	17	-3,05	1,1E-09	152	5,6	-4,77	1,9E-17	17	5,08	-1,76	1,8E-03
ACIAD2772	fbpF	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	360	95	-1,93	2,0E-05	394	64	-2,63	5,0E-10	97	58	-0,74	5,9E-02
ACIAD2773	fbpE	putative outer membrane porin, receptor for Fe(III)-coprogen, Fe(III)-ferrioxamine B and Fe(III)-rhodotruclic acid uptake (FhuE)	265	47	-2,48	9,7E-08	290	28	-3,39	1,2E-13	48	25	-0,95	2,6E-02
ACIAD2774	fbpD	putative flavoprotein oxidoreductase	116	13	-3,18	1,6E-09	127	11	-3,48	6,1E-11	13	10	-0,34	6,3E-01
ACIAD3161	-	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate- homocysteine methyltransferase	852	239	-1,83	1,0E-05	929	59	-3,98	9,9E-23	244	54	-2,19	3,0E-12
ACIAD3522	-	conserved hypothetical protein	2507	217	-3,53	2,3E-21	2748	5016	0,87	8,4E-02	222	4553	4,36	3,7E-70
ACIAD3523	metE	conserved hypothetical protein; putative conserved domain	2,57E+04	1268	-4,34	1,5E-33	2,82E+04	5,31E+04	0,91	1,3E-02	1296	4,83E+04	5,22	1,5E-88
ACIAD3524	-	conserved hypothetical protein; putative conserved domain	1,42E+04	766	-4,21	3,6E-30	1,56E+04	3,29E+04	1,08	5,7E-03	783	2,98E+04	5,25	2,5E-92
ACIAD3559	-	conserved hypothetical protein; putative conserved domain	618	160	-1,95	2,6E-06	675	113	-2,58	2,8E-11	164	102	-0,68	5,7E-02

Annexe 16 : Liste des 25 ACIADs exprimés sur sulfate avec un nombre de lectures >100 et au moins 3 fois sous-exprimés sur L-méthionine. Sont aussi indiquées les variations sur L-cystéine.

Publication

Parallel evolution of non-homologous isofunctional enzymes in methionine biosynthesis

Karine Bastard^{1-4,7}, Alain Perret^{1-4,7}, Aline Mariage¹⁻⁴, Thomas Bessonnet¹⁻⁴, Agnès Pinet-Turpault¹⁻⁴, Jean-Louis Petit¹⁻⁴, Ekaterina Darii¹⁻⁴, Pascal Bazire¹⁻⁴, Carine Vergne-Vaxelaire¹⁻⁴, Clémence Brewée¹⁻⁴, Adrien Debard¹⁻⁴, Virginie Pellouin¹⁻⁴, Marielle Besnard-Gonnet¹⁻⁴, François Artiguenave⁵, Claudine Médigue¹⁻⁴, David Vallenet¹⁻⁴, Antoine Danchin⁶ , Anne Zaparucha¹⁻⁴, Jean Weissenbach¹⁻⁴, Marcel Salanoubat¹⁻⁴ & Véronique de Berardinis^{1-4*}

Experimental validation of enzyme function is crucial for genome interpretation, but it remains challenging because it cannot be scaled up to accommodate the constant accumulation of genome sequences. We tackled this issue for the MetA and MetX enzyme families, phylogenetically unrelated families of acyl-L-homoserine transferases involved in L-methionine biosynthesis. Members of these families are prone to incorrect annotation because MetX and MetA enzymes are assumed to always use acetyl-CoA and succinyl-CoA, respectively. We determined the enzymatic activities of 100 enzymes from diverse species, and interpreted the results by structural classification of active sites based on protein structure modeling. We predict that >60% of the 10,000 sequences from these families currently present in databases are incorrectly annotated, and suggest that acetyl-CoA was originally the sole substrate of these isofunctional enzymes, which evolved to use exclusively succinyl-CoA in the most recent bacteria. We also uncovered a divergent subgroup of MetX enzymes in fungi that participate only in L-cysteine biosynthesis as O-succinyl-L-serine transferases.

Accurate annotation of enzyme function is a key issue for genome interpretation, metabolic modeling and synthetic biology^{1,2}. Nevertheless, only a tiny fraction of enzyme functions have been experimentally established; in most cases, function is extrapolated from a small number of characterized proteins³. Because it is possible to classify proteins into families and superfamilies on the basis of similarities in sequence and/or structure, sequence similarity is often used to assign enzyme function. However, most families are not isofunctional and contain enzymes with functions that have diverged through mutations and local insertions and/or deletions. Thus, because proteins with high sequence similarity might not have the same function⁴, extrapolation of a function to all members of a protein family can lead to overannotation^{3,5}. As a consequence, the rate of mispredicted functions is high^{3,6,7}. These errors propagate through databases and impede recognition of the actual value of genome sequences. Although experimental work guided by bioinformatics has been initiated^{8,9}, large-scale experiments that sample the diversity of a family, streamlined by computational methods, are valuable for high-quality annotation¹⁰. Here we used extensive *in vitro* assays and protein modeling to reassign the molecular function of the enzymes that catalyze the first step of the ubiquitous L-methionine biosynthetic pathway (**Supplementary Results, Supplementary Fig. 1**), which are subject to incorrect annotation.

Acylation of L-homoserine (**1**) is the first step in this metabolic pathway in bacteria and fungi^{11,12}, and is catalyzed by either MetA or MetX. These two unrelated proteins do not share sequence or structural similarity, and their corresponding genes probably evolved independently¹². It is accepted that L-homoserine is acylated with succinyl-CoA (**2**) by MetA or with acetyl-CoA (**3**) by MetX to form O-succinyl-L-homoserine (**4**) or O-acetyl-L-homoserine (**5**), respectively. Despite the larger distribution of MetX enzymes

among bacteria and fungi¹², few of them have been biochemically characterized so far (**Supplementary Table 1**). Nevertheless, because bibliographic sources state that MetX enzymes use acetyl-CoA, all enzymes encoded by *metX* are annotated as L-homoserine O-acetyltransferases (HATs; Enzyme Commission number (EC) 2.3.1.31). However, we characterized MetX from the Pseudomonadale *Acinetobacter baylyi* ADP1 (MetX_{ADP1}), which was reported to complement an *Escherichia coli metA* mutant¹³, as an L-homoserine O-succinyltransferase (HST; EC 2.3.1.46). This is consistent with the observation of HST activity in *Pseudomonas aeruginosa* cell-free extracts¹⁴. Together, these data raised doubts regarding the relevance of MetX annotation, and instead suggested a divergence in function within this family leading to coding not only for HATs, but also for HSTs. This situation is reminiscent of what has been observed for MetA. The first biochemical studies with MetA from *E. coli*^{15,16} (MetA_{coli}) led to the overgeneralization that genes homologous to *E. coli metA* code for HSTs. However, various MetA-family enzymes are HATs¹⁷⁻²¹, as reported in **Supplementary Table 1**. Past structural and functional investigations of MetA from *Bacillus cereus* (MetA_{cereus}) showed that substitution of the glutamate in position 111 in its active site (Glu111_{cereus}) with a glycine, identified in the same position in *E. coli* (Gly111_{coli}), switches the activity from HAT to HST, leading to the proposal that MetA proteins diverged at some point into two functional families defined by the presence of either glutamate or glycine at this key position²². However, it is estimated that 20% of MetA enzymes have neither glutamate nor glycine at this position¹¹, which impedes their automatic and accurate functional assignment.

To understand the structural determinants that drive the acyl-CoA specificity of these two families of nonhomologous isofunctional enzymes²³, we carried out large-scale functional and structural analyses with the goal of complete reassignment. We used experimental

¹CEA, DRF, Genoscope, Evry, France. ²CNRS, UMR8030 Génomique Métabolique, Evry, France. ³Université d'Evry Val d'Essonne, Evry, France. ⁴Université Paris-Saclay, Evry, France. ⁵CEA, DRF, Centre National de Génotypage, Evry, France. ⁶Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France. ⁷These authors contributed equally to this work. *e-mail: vberard@genoscope.cns.fr

characterization of L-homoserine O-acyltransferases gathered from 100 MetX and MetA sequences representative of prokaryotic biodiversity to conduct our bioinformatic analysis. Because three-dimensional models are particularly suitable for comparative studies across complete protein families^{24,25}, we carried out a structural analysis based on homology modeling and classification of active sites^{5,26}. We identified the specific determining positions (SDPs) responsible for acyl-CoA specificity in the active sites of MetX and MetA enzymes, and built a decision tree dedicated to their functional annotation. We predict that >60% of the 10,000 sequences from these families currently in databases are incorrectly annotated. We mapped these predictions on the NCBI taxonomy cladogram and found that ancestral MetX and MetA had HAT activity and evolved in parallel toward HST activity. Finally, we discovered that 10% of MetX enzymes are paralogs that participate in L-cysteine synthesis in fungi by forming the novel metabolite O-succinyl-L-serine.

RESULTS

Rational selection and enzymatic screening

To obtain a representative picture of acyl-CoA use in the first step of L-methionine biosynthesis, we selected enzymes representative of the overall prokaryotic biodiversity and characterized their L-homoserine O-acyltransferase activity. We retrieved MetA and MetX sequences identified by InterPro homoserine succinyltransferase and homoserine acetyltransferase signatures (IPR005697 and IPR008220, respectively), then selected enzymes from among the different taxonomic orders. We refined the selection of MetA enzymes by multiple sequence alignment, considering sequences for which we found an amino acid variant of Glu111_{ceresus} or Gly111_{coli}. Because some *metX* genes in Proteobacteria (Supplementary Fig. 2) are cotranscribed with *metW*²⁷, a gene of unknown function that we observed to be essential for MetX activity, we attempted to always clone *metX* with *metW*. As no archaeal MetX has been characterized

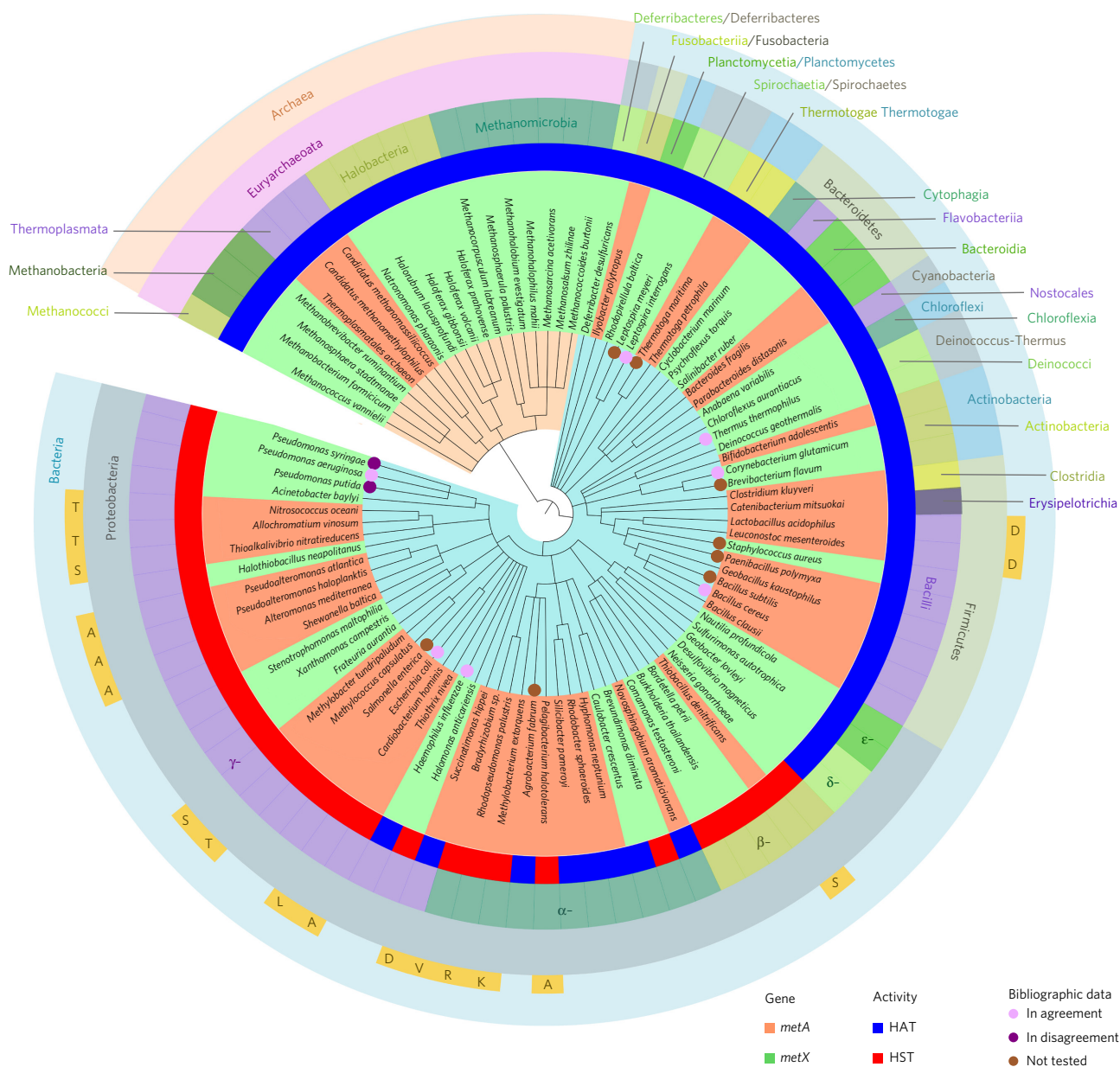


Figure 1 | Mapping of the experimentally determined activities of MetA and MetX on a taxonomic cladogram. The NCBI taxonomy-based cladogram was built with ETE2 (ref. 48) and represented with iTOL⁴⁹, using a selection of bacteria and archaea hosting the candidate *metA* and *metX*. The genus and species of each hosting bacteria is included. The inner ring indicates enzymatic activity. The intermediate and external rings indicate the taxonomic class and phylum, respectively. MetA residues variant to Glu111_{ceresus} or Gly111_{coli} are indicated in yellow boxes.

© 2017 Nature America, Inc., part of Springer Nature. All rights reserved.

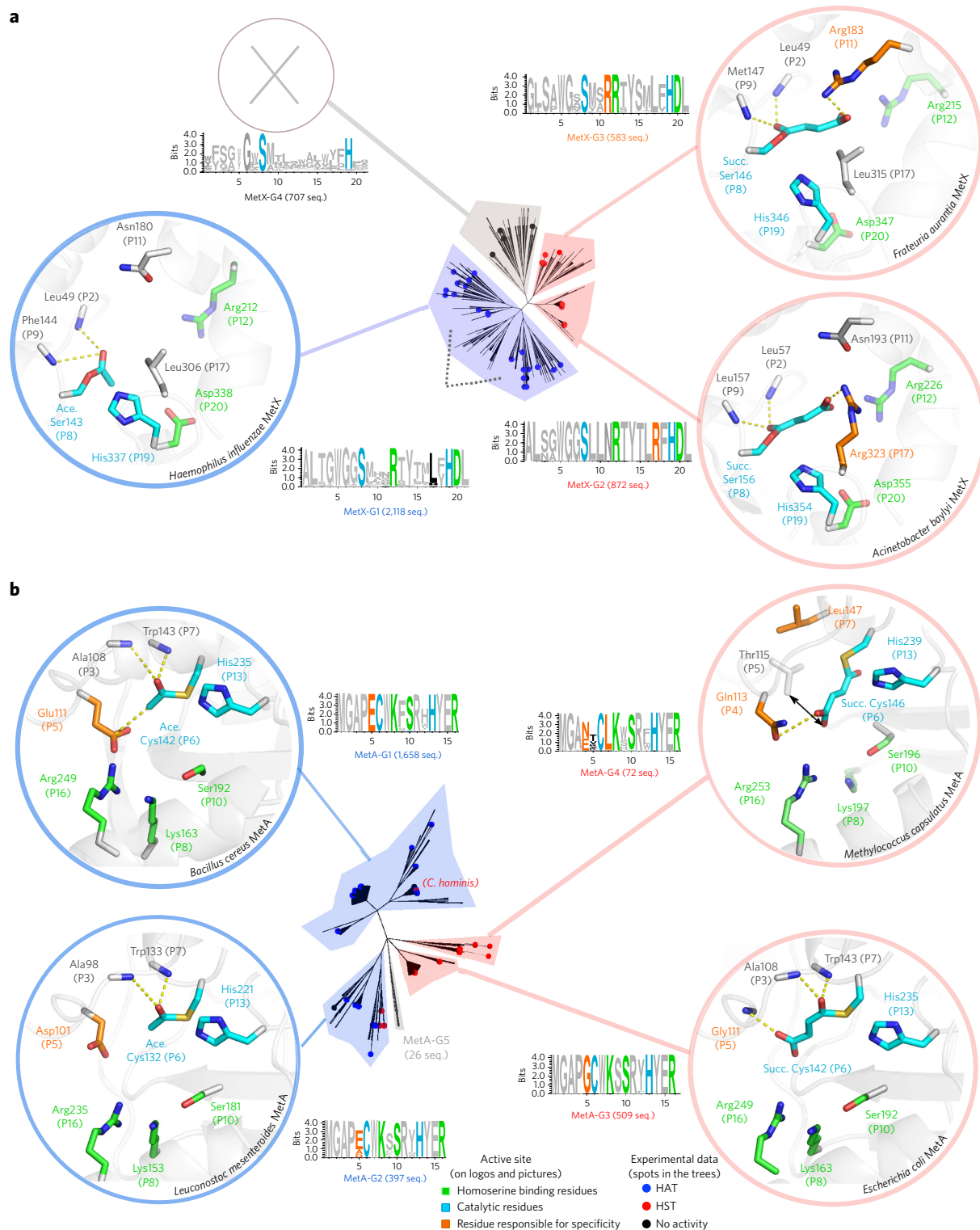


Figure 2 | Dividing MetX and MetA families into groups with similar active sites. (a,b) Hierarchical trees of MetX (a) and MetA (b) active sites generated by ASMC, containing 4,280 and 2,662 proteins, respectively. The number of sequences (seq.) for each group is indicated under the logo, which represents the conservation of the active site residues. The SDP (i.e., the residue responsible for specificity), conserved catalytic residues and L-homoserine binding residues are indicated. Active sites are shown for one member of each group, along with the bacterium name. Acyl-enzyme intermediates (Online Methods) are indicated by “Ace. Ser” (acetylated serine) and “Succ. Ser” (succinylated serine) for MetX, and by “Ace. Cys” and “Succ. Cys” for MetA. The yellow dashed lines indicate electrostatic interactions. Structures of MetX-G4 and MetA-G5 enzymes are not depicted owing to the heterogeneity of these groups. (a) The subgroup of MetX-G1 for which there are no experimental data (indicated by an open gray arrow with dashed lines) contains sequences mainly from eukaryotes, for which enzymes have not been selected for experiments. (b) In MetA-G4, the residue in logo position 5 (here Thr115) is too far away (6.2 Å; black double-headed arrow) to impede the accommodation of a succinyl moiety. MetA from *Cardiobacterium hominis* (HST) was erroneously classified as a MetA-G1 (HAT) enzyme because of the Phe in logo position 9, but it indeed has the characteristics of a MetA-G4 enzyme (i.e., Gln or Glu in logo position 4, and Leu in logo position 7).

Table 1 | Kinetic parameters of wild-type and mutant MetX enzymes from *A. baylyi* ADP1 and *H. influenzae*

	L-Homoserine			Acetyl-CoA		Succinyl-CoA	
	k_{cat} (s ⁻¹)	K_{m} (μM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (s ⁻¹ M ⁻¹)	K_{m} (μM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (s ⁻¹ M ⁻¹)	K_{m} (μM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (s ⁻¹ M ⁻¹)
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1 (wild type)	3.42 ± 0.30	484 ± 65	7.1 × 10 ³	ND	ND	625 ± 98	5.5 × 10 ³
<i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1 (R323L)	6.85 ± 0.96	1,096 ± 252	6.2 × 10 ³	3,984 ± 443	1.7 × 10 ³	ND	ND
<i>Haemophilus influenzae</i> (wild type)	5.0 ± 0.76	570 ± 140	8.7 × 10 ³	586 ± 140	8.5 × 10 ³	ND	ND
<i>Haemophilus influenzae</i> (L306R)	2.6 ± 0.35	4,027 ± 463	0.64 × 10 ³	ND	ND	1,366 ± 100	1.9 × 10 ³

Values correspond to the average of two replicates (± s.d.). ND, not detected.

to our knowledge, we selected enzymes from Euryarchaeota, the phylum in which we detected the most species with *metX*. We finally examined archaeal MetA, detected in *Thermoplasmata* species. From the 125 enzymes (73 MetX and 52 MetA) selected (Supplementary Fig. 2), we cloned 117 (Supplementary Data Set 1) and purified and assayed 104.

Results are summarized in Figure 1 and detailed in Supplementary Tables 2 and 3. We tested 42 MetA and 62 MetX enzymes. About 5% of MetA and 19% of MetX enzymes were inactive with the substrates tested. Notably, one-third of the MetX enzymes were HSTs, which shows that this activity is not restricted to MetX_{ADP1}. In bacteria, L-homoserine O-acyltransferase activities were widespread and observed in both enzyme families, contradicting their functional annotation in databases (Fig. 1). We found that HST activity could be catalyzed by MetA enzymes with residues other than Gly111_{coli}, and we determined substrate specificity for eight alternative residues at this position (Fig. 1). In contrast, we detected HAT activity only for MetA enzymes with acidic residues at this location. Finally, all tested archaeal enzymes were HATs, regardless of the encoding gene.

Pairwise sequence comparisons of MetX showed that average sequence identity among experimentally tested HAT MetX enzymes was 41%, whereas it was 43% between HAT and HST MetX enzymes. Consequently, predictions of acyl-CoA use for MetX based on sequence identity will inevitably be error-prone. We carried out a three-dimensional analysis of the active sites of MetX-family proteins to determine the acyl-CoA-binding residues. Similarly, because we had found that MetA enzymes were HSTs when they contained seven out of the eight alternative residues at position 111, we investigated the role of this position in influencing acyl-CoA use.

Arginines determine HST activity in the MetX family

We aimed to identify the residues that influence substrate specificity in all members of the MetX family. However, because of the substantial sequence diversity (Supplementary Fig. 3), multiple sequence alignment yielded numerous large gaps around the catalytic residues. As structural information improves multiple sequence alignments^{28,29}, and because three-dimensional models of proteins enable assessments of alignment quality³⁰, we used the Active Sites Modeling and Clustering method (ASMC)²⁶. We carried out homology modeling with the nonredundant set of sequences, using the seven available crystallographic structures as templates (Supplementary Fig. 4). We modeled and validated 4,280 proteins (95% of the family) (Supplementary Fig. 5 and Supplementary Data Set 2). We extracted the active site residues (determined for the *Haemophilus influenzae* enzyme by mutagenesis³¹) from all models and submitted them to a sorting algorithm that identified the most discriminative ones. The resulting hierarchical classification of the active sites revealed four groups (Fig. 2a). Mapping of the experimental data on the ASMC classification (Supplementary Data Set 3) demonstrated a strong match between activities and active site groups: HAT enzymes were in group 1 (MetX-G1), whereas HSTs fell into two groups (MetX-G2 and MetX-G3). Enzymes for which no activity was detected were classified as MetX-G4.

The conservation of the active site residues in each group is represented in Figure 2a. The correspondence between the position of the residues in the logo and in the active site is illustrated by the crystallographic structure of MetX_{influenzae} (PDB 2B61) (Supplementary Fig. 6a,b). Two residues of the catalytic triad, Ser143 and His337, in logo positions 8 and 19, respectively, are conserved in all groups. The third member of the triad, Asp304, is buried in the active site and was not detected by the algorithm. Two other residues—Arg in logo position 12, and Asp in logo position 20—are also conserved in groups for which activities were observed. As MetX was never cocrystallized with a substrate, we docked L-homoserine into the active site of MetX_{influenzae} *in silico*. In our model, these two residues bind L-homoserine (Supplementary Fig. 6c,d), as previously predicted³¹. Their absence in MetX-G4 enzymes may explain why L-homoserine is never acylated despite the presence of the catalytic residues.

The specificity of each ASMC group is strictly correlated with the presence of either one or two conserved residues in the logo that are absent in the other groups (i.e., SDPs). To understand how SDPs influence enzyme specificity, we first docked each acyl-CoA into the active site of one member of each group *in silico* (Supplementary Table 4). Then, we built the acyl-enzyme intermediate model resulting from transfer of the acyl group in the two-step reaction mechanism³¹ (Fig. 2a). The oxygens of both acetylated and succinylated serine form hydrogen bonds with two backbone amide NH groups of the oxyanion hole (formed by residues in logo positions 2 and 9). However, the acyl moiety is oriented differently in the active site depending on the nature of the acyl-CoA. In groups of proteins that use succinyl-CoA, the SDP is an arginine located in position 17 or position 11 of the logo for MetX-G2 or MetX-G3, respectively. The guanidino groups of these two arginines occupy the same position in the active site, and both interact with the carboxylate group of the succinylated serine via ionic interactions. Conversely, in enzymes from MetX-G1, which use acetyl-CoA, no SDP was identified. In this group, the methyl moiety of the acetylated serine is not involved in specific interactions and is hosted in a region other than the one that accommodates the succinyl moiety (Supplementary Fig. 7a). This suggests that the archetypal form of MetX (MetX-G1) exhibits HAT activity, whereas HST activity is due to the presence of an Arg in logo position 11 or 17. In other words, MetX enzymes would have evolved in two different ways to use succinyl-CoA.

To test whether MetX enzymes require an arginine in logo position 17 in order to use succinyl-CoA, we generated mutants of two enzymes from MetX-G2 and MetX-G1, namely, MetX_{ADP1} (UniProt Q6FEQ3) and MetX_{influenzae} (UniProt P45131), respectively. MetX_{ADP1} R323L did not show detectable activity with succinyl-CoA but formed O-acetyl-L-homoserine (Table 1). The mutation shifted the acyl-CoA specificity but did not substantially affect its efficiency (from 5.5 × 10³ to 1.7 × 10³ s⁻¹ M⁻¹). Similarly, MetX_{influenzae} L306R catalyzed only O-succinyl-L-homoserine synthesis (Table 1), with similar efficiency (from 8.5 × 10³ to 1.9 × 10³ s⁻¹ M⁻¹). Thus, a single amino acid substitution is sufficient to switch the acyl-CoA specificity in MetX, as observed for MetA²². We built on these experimental observations by structural analysis. First, the loss of the positive charge of Arg323 in MetX_{ADP1} R323L suppressed the

attraction of succinyl-CoA to the bottom of the binding pocket and impaired its ability to position itself appropriately for reaction with the catalytic serine. Furthermore, the succinyl-CoA moiety cannot be accommodated in the region that hosts acetyl-CoA because of steric hindrance (Supplementary Fig. 7a). In contrast, the attraction of acetyl-CoA by Arg306 at the bottom of the pocket in the MetX_{influenzae} mutant probably prevents it from assuming the correct position to covalently link the catalytic serine (Supplementary Fig. 7b).

Novel residues control HST activity in the MetA family

To assess the variability of residues found at the key position in MetA proteins, we applied the same strategy as for the MetX family. We carried out homology modeling on a nonredundant set of sequences, using as templates the two available crystallographic structures: MetA_{ceruus} in complex with L-homoserine³² (PDB 2VDJ), and the apo form of the enzyme from *Thermogota maritima* (PDB 2H2W). In total, we built 2,662 models (96% of the family). Docking results are presented in Supplementary Table 5. Experimental data were consistent with the groups formed by the ASMC classification (Supplementary Data Set 3 and Fig. 2b). HAT enzymes were distributed between two groups (MetA-G1 and MetA-G2), as were HST enzymes (MetA-G3 and MetA-G4). The correspondence between the positions of the residues in the active site and in the logos is shown for the crystallographic structure of MetA_{ceruus} in Supplementary Figure 8. In MetA_{ceruus} crystallized with L-homoserine³², three residues that bind L-homoserine—Lys163, Ser192 and Arg249 (logo positions 8, 10 and 16, respectively)—were conserved in all ASMC groups. Two catalytic residues³³, Cys142 and His235 (logo positions 6 and 13, respectively), were also conserved. As for MetX, the oxygen atom of the carboxylic group of both acetylated and succinylated cysteine (except for MetA-G4) forms hydrogen bonds with two backbone amide NH groups of the oxyanion hole formed by residues in logo positions 3 and 7 (Fig. 2b). Likewise, the functional groups of the residues that interact with L-homoserine, with the catalytic nucleophilic base, form triangles with almost identical dimensions in MetA and MetX enzymes (Supplementary Fig. 9). Consequently, although they have very distinct active sites, MetA and MetX enzymes show a conserved three-dimensional constellation of polarized atoms.

MetA-G1 and MetA-G3 correspond, respectively, to HAT with Glu111 and HST with Gly111, as previously proposed²² (Fig. 2b). However, MetA-G2 is more complex because it contains HATs and HSTs. More than 80% of the enzymes in this group have an acidic residue in logo position 5 (consistent with HAT activity), but Ala is present in nearly 20% of sequences, which suggests HST activity. ASMC placed HSTs with Ala in logo position 5 in MetA-G2 because their active sites are more similar to those of enzymes in MetA-G2 than those in MetA-G3. Our acyl-enzyme intermediate models confirmed that acidic residues in logo position 5 prevent the accommodation of succinyl-CoA, whereas small residues such as alanine and glycine permit the fitting of succinyl-CoA²². In MetA-G4, diverse residues are found in logo position 5 (Thr, Val, Arg, Ser, Ile, etc.). Two SDPs—Asn or Glu in position 4, and Leu in position 7—modify the shape of the active site cavity, and thus the succinylated cysteine cannot interact as it does in MetA-G3 enzymes (Fig. 2b). In this configuration, the residue in logo position 5, which is too distant to interact with the succinylated cysteine, does not affect acyl-CoA selection. In summary, the situation with MetA is different from the one observed with MetX because MetA does not have an archetypal form: HAT activity necessarily means an acidic residue in logo position 5. Nevertheless, as observed for the MetX family, MetA enzymes also developed two independent ways to engage in HST activity, as illustrated by MetA-G3 and MetA-G4, two groups that are not phylogenetically close (Supplementary Fig. 10).

As these enzymes can use alternative acyl donors²¹, we took advantage of the ASMC classification to test representatives of each group

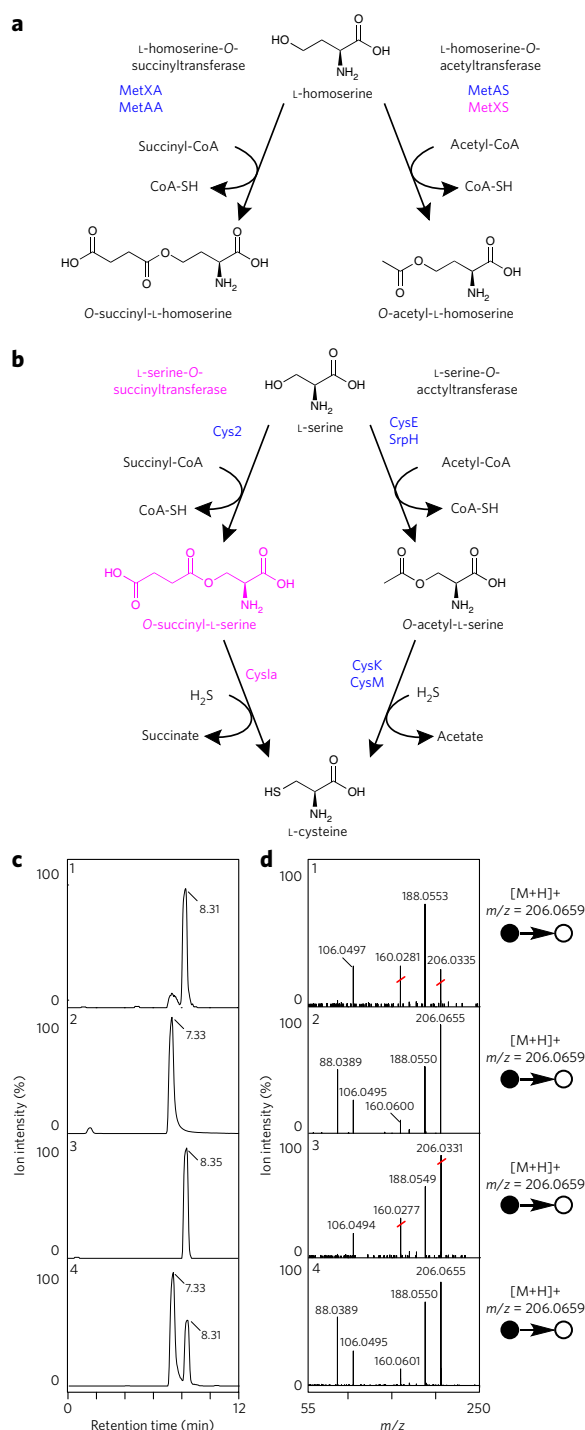


Figure 3 | Biosynthetic roles of MetA and MetX enzymes. (a,b) Enzymatic steps catalyzed in the L-methionine (a) and L-cysteine (b) biosynthetic pathways. MetXA and MetAA, L-homoserine-O-acetyltransferases coded by *metX* and *metA*, respectively; MetXS and MetAS, L-homoserine-O-succinyltransferases coded by *metX* and *metA*, respectively. Novel biochemical features are shown in pink. (c,d) The product formed by Cys2 is O-succinyl-L-serine. (c) Extracted ion chromatograms (5-p.p.m. accuracy). (d) Collision-induced dissociation tandem mass spectra (normalized collision energy, 18%). 1, N-succinyl-L-serine reference standard; 2, O-succinyl-L-serine reference standard; 3, spontaneous formation of N-succinyl-L-serine in a control experiment containing 500 μ M succinyl-CoA and 1 mM L-serine, devoid of Cys2; 4, enzymatic formation of O-succinyl-L-serine in the presence of 500 μ M succinyl-CoA, 1 mM L-serine, and Cys2. The mass spectra correspond to the compound eluted at 7.33 min.

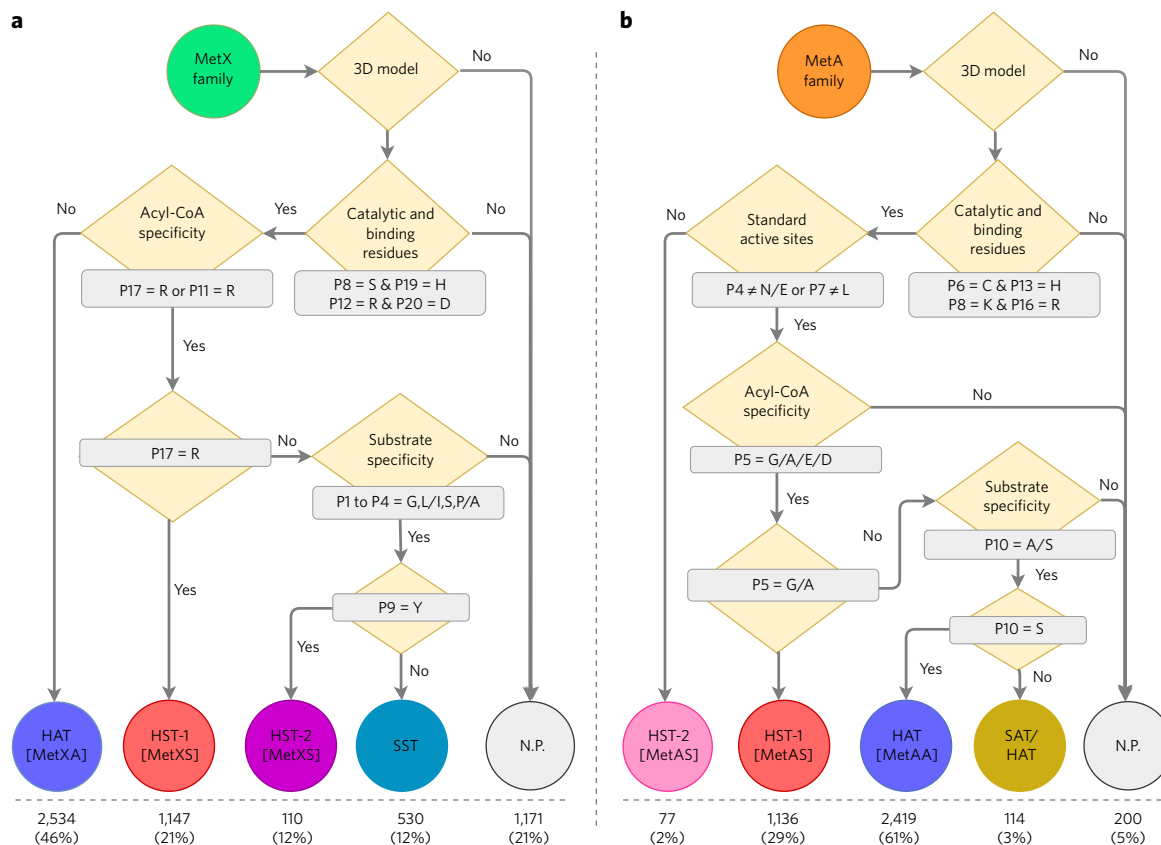


Figure 4 | Decision trees for annotation of MetX and MetA enzymes. (a,b) Rules for predicting the enzymatic activities of (a) MetX (reference structure, MetX_{influenzae}; PDB 2B61) and (b) MetA (reference structure, MetA_{cerus}; PDB 2VDJ) enzymes, based on the SDP residues highlighted by the structural analysis. Sequences corresponding to InterPro IPR005697 (MetA) and InterPro IPR008220 (MetX) were subjected to homology modeling as described in the Online Methods. Sequences that could not be modeled were classified as 'not predicted' (N.P.). Models were aligned with the reference crystallographic structure of the family, and the active site residues were extracted to form a logo sequence (Fig. 2). We predicted functions by inspecting the SDPs. The number of proteins in each prediction category is indicated at the bottom. The new enzyme nomenclature that we suggested to Swiss-Prot is shown in brackets.

with various acyl donors, to investigate a potential link between the carbon chain length of acyl donors and the structure of active sites. We evaluated propionyl-CoA (6) and butyryl-CoA (7), which have the same reactivity as acetyl-CoA but include one and two supplemental carbon atoms, respectively. We also tested malonyl-CoA (8) and glutaryl-CoA (9), which are equivalent to 6 and 7, but for succinyl-CoA rather than acetyl-CoA. In the tested conditions, the enzymes showed low substrate promiscuity (Supplementary Table 6). HAT activity required acyl donors with a terminal methyl group; HST activity required acyl donors with a terminal carboxyl group.

O-Succinyl-L-serine formed in L-cysteine biosynthesis

ASMC analysis of the MetX family shed further light on those enzymes' functional capabilities. We found that 67% of fungi for which the complete genome sequence is available possess two *metX* genes encoding proteins in two distinct groups, MetX-G1 and MetX-G3 (Supplementary Fig. 11a). Fungal L-homoserine transacetylases³⁴, referred to collectively as Met2, are found exclusively in MetX-G1, which contains solely HATs. Conversely, their MetX homologs belong to MetX-G3. This group encompasses enzymes from *Aspergillus nidulans*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Hansenula polymorpha* for which mutations in the coding genes lead to L-cysteine auxotrophy^{35–37}. It was thus hypothesized that these enzymes (referred to as Cys2 enzymes) are novel L-serine O-acetyltransferases³⁶. As we had demonstrated that enzymes from MetX-G3 use succinyl-CoA, Cys2 enzymes might instead constitute a unique class of L-serine O-succinyltransferases. The corollary would be the formation of a previously unreported metabolite: O-succinyl-L-serine.

Cys2 enzymes are more specifically located in the subgroup MetX-G3c (Supplementary Fig. 11a) and share ~40% identity with enzymes of MetX-G3a, a subgroup that contains bacterial enzymes from the order Xanthomonadales. Enzymes from MetX-G3c and MetX-G3a are phylogenetically close (Supplementary Fig. 12) and probably share the same function. Like fungi, members of Xanthomonadales have two MetX homologs. The second group of MetX proteins are in MetX-G3b, and probably participate in L-methionine biosynthesis, according to the genomic context of their coding genes (Supplementary Fig. 13).

From a structural point of view, enzymes from MetX-G3a and MetX-G3c contain the previously described Gly-Leu-Ser-Pro/Ala motif (positions 1–4 of the logo)³⁸. These residues form the oxyanion hole of the active site, and are anticipated to be important factors in determining the preference for L-serine over L-homoserine. Enzymes from MetX-G3b have a similar motif (Gly-Ile-Ser-Ala) but contain a conserved Tyr in position 9 of the logo. We expect this residue to impede binding of L-serine and promote binding of L-homoserine instead (Supplementary Fig. 11a). Thus, two subgroups of MetX-G3 (MetX-G3a and MetX-G3c) may constitute a previously undescribed family of bacterial and eukaryotic L-serine O-succinyltransferases. In summary, MetX enzymes would be involved not only in L-methionine biosynthesis (Fig. 3a) but also in the L-cysteine biosynthetic pathway (Fig. 3b).

According to this hypothesis, Cys2 from *A. nidulans* (UniProt A0A1D3PCM3) and *S. pombe* (UniProt Q10341) would have higher activity with L-serine (Supplementary Table 7). To identify the compound formed with L-serine and succinyl-CoA, we chemically

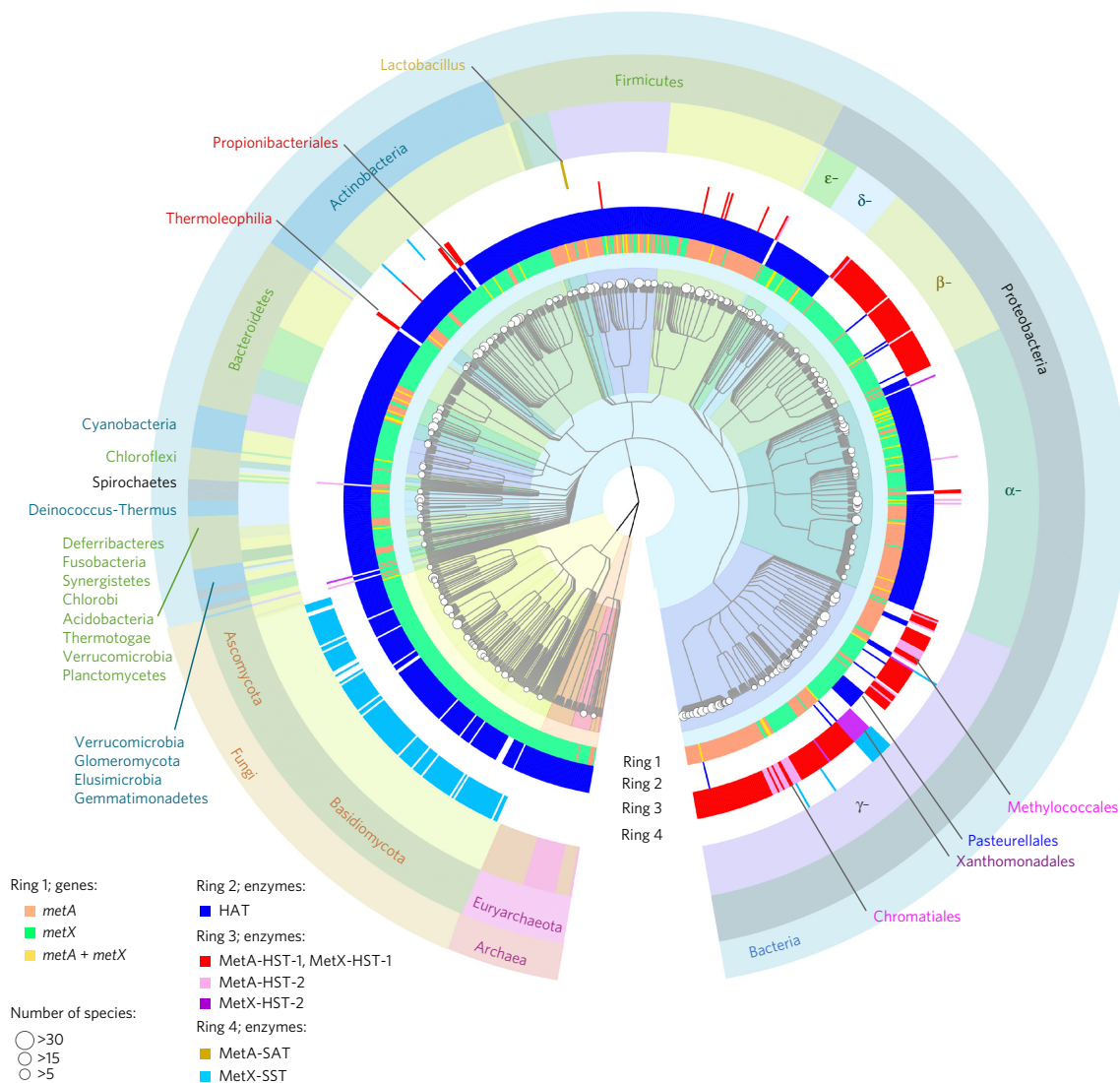


Figure 5 | Prediction of acyltransferase activities of MetX and MetA in bacteria, archaea and fungi. We used the annotation decision trees (Fig. 4) to predict activities. The NCBI taxonomy-based cladogram, built with fully sequenced genomes with ETE2, was drawn with Graphlan⁵⁰ and collapsed at the genus level. The number of organisms represented is indicated by the radius of the white circle at the end of each branch. Ring 1 shows the coding genes—*metX*, *metA* or both. HAT is indicated in ring 2. HSTs are indicated in ring 3; the second structural approach adopted by bacteria to achieve HST activity (i.e., HST-2) is highlighted in purple for MetX and in pink for MetA. L-serine O-acetyltransferase (SAT) and L-serine O-succinyltransferase (SST) are indicated in ring 4.

synthesized *O*-succinyl-L-serine (10) and *N*-succinyl-L-serine (11) and used them as reference standards (Supplementary Figs. 14 and 15). We carried out LC-MS analysis and found similar retention times and MS² profiles for the metabolite produced by Cys2_{pombe} and authentic *O*-succinyl-L-serine, which indicated that the latter was enzymatically formed by Cys2_{pombe} (Fig. 3c,d). Next, we characterized Cys2_{pombe} with succinyl-CoA in the presence of L-homoserine and L-serine. Its catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) was more than 300 times higher with L-serine than with L-homoserine (6.2×10^3 versus $19 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; Supplementary Table 8), and implied the formation of *O*-succinyl-L-serine in the cell. The same reasoning applied for the next enzyme in the L-cysteine biosynthetic pathway, L-cysteine synthase (Cys1a). Cys1a_{pombe} was almost three times less efficient with *O*-acetyl-L-serine (12) than with *O*-succinyl-L-serine (4.5×10^3 versus $1.2 \times 10^4 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; Supplementary Table 9), which suggested that *S. pombe* forms L-cysteine via *O*-succinyl-L-serine (CHEBI 134286). Finally, we detected *O*-succinyl-L-serine in the metabolome of the wild-type strain of *S. pombe*, but not in a Cys2 mutant (FY17212)³⁶ (Supplementary Fig. 16). It should be noted that we did not detect *O*-acetyl-L-serine in the *S. pombe* metabolome.

MetA can also participate in L-cysteine biosynthesis. Acetylation of L-serine by a MetA homolog has been reported in the bacterium *Lactobacillus casei*³⁹. We indeed found that MetA from *Lactobacillus acidophilus* acetylated L-serine and L-homoserine with similar apparent rates (Supplementary Table 7). From a three-dimensional perspective, these enzymes belong to a subgroup of MetA-G2 in which an Ala is found in position 10 of the logo, as in a subgroup of MetA-G1, instead of a conserved Ser (Supplementary Fig. 11b). We found that enzymes with a Ser in logo position 10 were unable to acetylate L-serine (Supplementary Table 7).

Acyl-CoA use is different in each domain of life

From the key residues we identified, we designed two decision trees for extensive assignment of acyl-CoA specificity for MetA and MetX enzymes (Fig. 4). We reexamined 3,946 MetA and 5,492 MetX sequences (Supplementary Data Set 4). This protein list can be parsed at <http://www.genoscope.cns.fr/metgenes/>. Of the 8,067 sequences with bona fide catalytic and L-homoserine binding residues for which a function could be assigned, we predicted that 62% use acetyl-CoA (Supplementary Fig. 17). Acyl-CoA use is mispredicted

for 68% of MetA enzymes and 41% of MetX enzymes in databases. We also predicted that 644 enzymes are *O*-succinyl-L-serine transferases. We could not predict a function for 1,371 enzymes; for 69% of these, the L-homoserine binding or catalytic residues were not detected, and the remaining sequences were not modeled owing to low homology with three-dimensional structures. At least 59% of unmodeled MetX enzymes may not be involved in L-methionine biosynthesis (Supplementary Fig. 18). We did not observe L-homoserine acylation by unmodeled enzymes encoded by genes with genomic contexts unrelated to methionine biosynthesis (Supplementary Table 2 and Supplementary Fig. 19a). Conversely, those encoded by genes found in a genomic context related to L-methionine biosynthesis are probably L-homoserine acyltransferases, as observed for *Brevundimonas diminuta* (Supplementary Table 2 and Supplementary Fig. 19b). We provided our reannotation decision tree to the Swiss-Prot Group at the Swiss Institute of Bioinformatics, who updated HAMAP signatures⁴⁰ MF_00295 and MF_00296 for MetA and MetX, respectively, and modified the corresponding annotation rules for the complete reannotation of these families and their correct propagation to the UniProtKB database.

We mapped activity predictions on the NCBI taxonomy cladogram (Fig. 5) built with fully sequenced genomes. Surprisingly, in both eukaryotes and archaea, only acetyl-CoA activates L-homoserine. In these two domains, this step is provided by MetX for 95% and 83% of the genera, respectively. Bacteria, however, use both acyl-CoAs, and acetylation is encountered in 68% of genera. Their acyl-CoA specificity is separated at the taxonomic class level, whereas *metA* and *metX* are scattered. Succinyl-CoA is used in β - and γ -proteobacteria, which are predicted to contain HST enzymes for about 100% and 89% of genera, respectively (Fig. 5).

Our predictions revealed intriguing features: in γ -proteobacteria, the order Pasteurellales is considered from an evolutionary perspective to be between Vibrionales and Enterobacteriales⁴¹. Nevertheless, Pasteurellales contains HAT MetX, whereas Vibrionales and Enterobacteriales contain HST-1 MetA (Supplementary Fig. 20). This observation raises questions about the phylogenetic relationship of these three bacterial orders. Moreover, lateral gene transfer from bacteria obviously occurred in archaea: Euryarchaeota probably acquired MetX through two independent events (Supplementary Fig. 21), as MetX enzymes from methanogens and from halophiles are more similar to their bacterial counterparts than to each other (Supplementary Figs. 12). For archaeal *metA*, the acquisition of a HAT-encoding gene seems to have taken place only in some thermoacidophiles (Supplementary Data Set 4).

DISCUSSION

We developed an experiment-based computational method that allows for proper annotation of the molecular function of the MetA and MetX enzyme families, which are involved in the first step of L-methionine biosynthesis. The global view of the use of acetyl- and succinyl-CoA helped us gain insight into the functional evolution of these families. Prokaryotes are separated into two groups depending on whether their cell envelopes contain one membrane (monoderms) or two (diderms). Monoderms are ancestral, and diderms originated from them⁴². The taxonomic mapping of predicted MetA and MetX activity illustrated that HATs are encountered mainly in monoderms, whereas HSTs are found mostly in the most recent diderms, β - and γ -proteobacteria. We therefore believe that HAT activity was originally provided by both MetX and MetA enzymes. Then, the divergence from HAT to HST occurred independently twice for each enzyme family, as attested to by the different structural solutions encountered in different genera, and also by the emergence of HSTs in phylogenetically distant organisms. This suggests an evolutionary drive that implemented HSTs in the most recent bacteria. Although a single nucleotide mutation can be sufficient to effect changes in acyl-CoA use (Supplementary Fig. 22), monoderms nevertheless

continue to use solely acetyl-CoA, which implies an opposite pressure. This complex functional evolution is most unusual, as the acquisition of HST activity originated neither from the duplication of an ancestor gene^{43,44} nor from an accumulation of mutations⁴⁵ in the active site. Furthermore, this sharp change in function does not seem to have resulted from the acquisition of a promiscuous enzymatic HST activity that served as an evolutionary starting point. In addition, this acyl-CoA use seems to correlate with the *O*-acyl-homoserine specificity of cystathionine γ -synthase, the subsequent enzyme of the L-methionine biosynthesis pathway. In β - and γ -proteobacteria, *O*-succinyl-L-homoserine is used preferentially, whereas *O*-acetyl-L-homoserine seems to be used by other classes⁴⁶. Acyl-CoA use in L-methionine biosynthesis is similar to that in the *meso*-diaminopimelate/lysine biosynthetic pathway. Two pathways exist, which differ in the identity of the acyl blocking group (acetate or succinate) that is added to L-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate (DAP) and later cleaved from the acylated DAP derivative. Acetyl-CoA seems to be used mostly by monoderms (except for Propionibacteriales from Actinobacteria, which are predicted to use succinyl-CoA for the synthesis of DAP and L-methionine), whereas succinyl-CoA is used preferentially in diderms⁴². At the moment it is not known what the metabolic constraints or advantages would be for organisms to use a two- or a four-carbon CoA ester to activate biosynthetic intermediates.

Finally, we found that most sequenced fungi genomes contain two homologous MetX enzymes, one of which diverged and is involved in L-cysteine, rather than L-methionine, biosynthesis. To our knowledge, these paralogs (Cys2) form the first class of L-serine *O*-succinyl transferases reported so far. This unanticipated feature further underlines the very complex relationship between the evolution of a protein sequence and its biochemical function, and therefore the difficulty of automating the functional annotation of protein-coding genes. Most cases require the development of specific annotation rules created with expert input on a family-by-family basis to capture and propagate complex annotations⁶. Except for the HAMAP annotation rules, for which the available literature is consulted so that residues specific for the function of a protein family can be extracted⁴⁰, the creation of subfamily profiles and annotation rules is an effort that has to be further developed.

In summary, our strategy based on clustering of active site residues allowed us to correct the functional annotation for thousands of sequences present in databases. This computational method could be applied to other families, such as those that are not iso-functional but contain members with functions that diverged as a result of incremental residue mutations in the active site^{6,47}.

Received 25 July 2016; accepted 22 March 2017;
published online 5 June 2017; corrected after print 10 July 2017

METHODS

Methods, including statements of data availability and any associated accession codes and references, are available in the [online version of the paper](#).

References

- Galperin, M.Y. & Koonin, E.V. From complete genome sequence to 'complete' understanding? *Trends Biotechnol.* **28**, 398–406 (2010).
- Hanson, A.D., Pribat, A., Waller, J.C. & de Crécy-Lagard, V. 'Unknown' proteins and 'orphan' enzymes: the missing half of the engineering parts list—and how to find it. *Biochem. J.* **425**, 1–11 (2009).
- Schnoes, A.M., Brown, S.D., Dodevski, I. & Babbitt, P.C. Annotation error in public databases: misannotation of molecular function in enzyme superfamilies. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000605 (2009).
- Soskine, M. & Tawfik, D.S. Mutational effects and the evolution of new protein functions. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 572–582 (2010).
- Bastard, K. *et al.* Revealing the hidden functional diversity of an enzyme family. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 42–49 (2014).
- de Crécy-Lagard, V. Quality annotations, a key frontier in the microbial sciences. *Microbe* **11**, 303–310 (2016).

7. Hsiao, T.L., Revelles, O., Chen, L., Sauer, U. & Vitkup, D. Automatic policing of biochemical annotations using genomic correlations. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 34–40 (2010).
8. Anton, B.P., Kasif, S., Roberts, R.J. & Steffen, M. Objective: biochemical function. *Front. Genet.* **5**, 210 (2014).
9. Gerlt, J.A. *et al.* The Enzyme Function Initiative. *Biochemistry* **50**, 9950–9962 (2011).
10. Zhang, X. *et al.* Assignment of function to a domain of unknown function: DUF1537 is a new kinase family in catabolic pathways for acid sugars. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, E4161–E4169 (2016).
11. Ferla, M.P. & Patrick, W.M. Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiology* **160**, 1571–1584 (2014).
12. Gophna, U., Baptiste, E., Doolittle, W.F., Biran, D. & Ron, E.Z. Evolutionary plasticity of methionine biosynthesis. *Gene* **355**, 48–57 (2005).
13. de Berardinis, V. *et al.* A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol. Syst. Biol.* **4**, 174 (2008).
14. Foglino, M., Borne, F., Bally, M., Ball, G. & Patte, J.C. A direct sulfhydrylation pathway is used for methionine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **141**, 431–439 (1995).
15. Rowbury, R.J. The accumulation of O-succinylhomoserine by *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.* **37**, 171–180 (1964).
16. Rowbury, R.J. & Woods, D.D. O-succinylhomoserine as an intermediate in the synthesis of cystathionine by *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **36**, 341–358 (1964).
17. Brush, A. & Paulus, H. The enzymic formation of O-acetylhomoserine in *Bacillus subtilis* and its regulation by methionine and S-adenosylmethionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **45**, 735–741 (1971).
18. Goudarzi, M. & Born, T.L. Purification and characterization of *Thermotoga maritima* homoserine transsuccinylase indicates it is a transacetylase. *Extremophiles* **10**, 469–478 (2006).
19. Rotem, O., Biran, D. & Ron, E.Z. Methionine biosynthesis in *Agrobacterium tumefaciens*: study of the first enzyme. *Res. Microbiol.* **164**, 12–16 (2013).
20. Wyman, A. & Paulus, H. Purification and properties of homoserine transacetylase from *Bacillus polymyxa*. *J. Biol. Chem.* **250**, 3897–3903 (1975).
21. Ziegler, K., Yusupov, M., Bishop, B. & Born, T.L. Substrate analysis of homoserine acyltransferase from *Bacillus cereus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 510–515 (2007).
22. Zubieta, C., Arkus, K.A., Cahoon, R.E. & Jez, J.M. A single amino acid change is responsible for evolution of acyltransferase specificity in bacterial methionine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 7561–7567 (2008).
23. Omelchenko, M.V., Galperin, M.Y., Wolf, Y.I. & Koonin, E.V. Non-homologous isofunctional enzymes: a systematic analysis of alternative solutions in enzyme evolution. *Biol. Direct* **5**, 31 (2010).
24. Hitchcock, D.S. *et al.* Structure-guided discovery of new deaminase enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 13927–13933 (2013).
25. Lukk, T. *et al.* Homology models guide discovery of diverse enzyme specificities among dipeptide epimerases in the enolase superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 4122–4127 (2012).
26. de Melo-Minardi, R.C., Bastard, K. & Artiguenave, F. Identification of subfamily-specific sites based on active sites modeling and clustering. *Bioinformatics* **26**, 3075–3082 (2010).
27. Picardeau, M., Bauby, H. & Saint Girons, I. Genetic evidence for the existence of two pathways for the biosynthesis of methionine in the *Leptospira* spp. *FEMS Microbiol. Lett.* **225**, 257–262 (2003).
28. Zhang, Z., Lindstam, M., Unge, J., Peterson, C. & Lu, G. Potential for dramatic improvement in sequence alignment against structures of remote homologous proteins by extracting structural information from multiple structure alignment. *J. Mol. Biol.* **332**, 127–142 (2003).
29. Hijikata, A., Yura, K., Noguti, T. & Go, M. Revisiting gap locations in amino acid sequence alignments and a proposal for a method to improve them by introducing solvent accessibility. *Proteins* **79**, 1868–1877 (2011).
30. Centeno, N.B., Planas-Iglesias, J. & Oliva, B. Comparative modelling of protein structure and its impact on microbial cell factories. *Microb. Cell Fact.* **4**, 20 (2005).
31. Mirza, I.A., Nazi, I., Korczynska, M., Wright, G.D. & Berghuis, A.M. Crystal structure of homoserine transacetylase from *Haemophilus influenzae* reveals a new family of α/β -hydrolases. *Biochemistry* **44**, 15768–15773 (2005).
32. Zubieta, C. *et al.* Crystal structure of homoserine O-succinyltransferase from *Bacillus cereus* at 2.4 Å resolution. *Proteins* **68**, 999–1005 (2007).
33. Coe, D.M. & Viola, R.E. Assessing the roles of essential functional groups in the mechanism of homoserine succinyltransferase. *Arch. Biochem. Biophys.* **461**, 211–218 (2007).
34. Yamagata, S., D'Andrea, R.J., Fujisaki, S., Isaji, M. & Nakamura, K. Cloning and bacterial expression of the CYS3 gene encoding cystathionine γ -lyase of *Saccharomyces cerevisiae* and the physicochemical and enzymatic properties of the protein. *J. Bacteriol.* **175**, 4800–4808 (1993).
35. Grynberg, M., Topczewski, J., Godzik, A. & Paszewski, A. The *Aspergillus nidulans* *cysA* gene encodes a novel type of serine O-acetyltransferase which is homologous to homoserine O-acetyltransferases. *Microbiology* **146**, 2695–2703 (2000).
36. Ma, Y. *et al.* Six new amino acid-auxotrophic markers for targeted gene integration and disruption in fission yeast. *Curr. Genet.* **52**, 97–105 (2007).
37. Sohn, M.J. *et al.* Novel cysteine-centered sulfur metabolic pathway in the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *PLoS One* **9**, e100725 (2014).
38. Oda, K., Matoba, Y., Kumagai, T., Noda, M. & Sugiyama, M. Crystallographic study to determine the substrate specificity of an L-serine-acetylating enzyme found in the D-cycloserine biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **195**, 1741–1749 (2013).
39. Bogicevic, B. *et al.* Cysteine biosynthesis in *Lactobacillus casei*: identification and characterization of a serine acetyltransferase. *FEMS Microbiol. Lett.* **363**, fnw012 (2016).
40. Pedruzzi, I. *et al.* HAMAP in 2015: updates to the protein family classification and annotation system. *Nucleic Acids Res.* **43**, D1064–D1070 (2015).
41. Gao, B., Mohan, R. & Gupta, R.S. Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the *Gammaproteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**, 234–247 (2009).
42. Gupta, R.S. Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek* **100**, 171–182 (2011).
43. Jensen, L.J., Ussery, D.W. & Brunak, S. Functionality of system components: conservation of protein function in protein feature space. *Genome Res.* **13**, 2444–2449 (2003).
44. Khersonsky, O., Roodveldt, C. & Tawfik, D.S. Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 498–508 (2006).
45. Furnham, N., Dawson, N.L., Rahman, S.A., Thornton, J.M. & Orengo, C.A. Large-scale analysis exploring evolution of catalytic machineries and mechanisms in enzyme superfamilies. *J. Mol. Biol.* **428**, 253–267 (2016).
46. Kanzaki, H., Kobayashi, M., Nagasawa, T. & Yamada, H. Distribution of two kinds of cystathionine γ -synthase in various bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **33**, 65–68 (1986).
47. Furnham, N., Garavelli, J.S., Apweiler, R. & Thornton, J.M. Missing in action: enzyme functional annotations in biological databases. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 521–525 (2009).
48. Huerta-Cepas, J., Dopazo, J. & Gabaldón, T. ETE: a Python environment for tree exploration. *BMC Bioinformatics* **11**, 24 (2010).
49. Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* **44**, W242–W245 (2016).
50. Asnicar, F., Weingart, G., Tickle, T.L., Huttenhower, C. & Segata, N. Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn. *PeerJ* **3**, e1029 (2015).

Acknowledgments

We are grateful to L. Stuani, L. Grenot, C. Gazaille, C. Richer, C. Pellé and P. Sirvain for excellent technical assistance. We thank G. Cohen, M. Bouzon-Bloch, M. Stam, A. Calteau, B. Viart and M. Sorokina for helpful discussion on the manuscript. We are indebted to P. Bowe for improvements to the manuscript. We are grateful to E. Coudert and C. Rivoire (the Swiss-Prot Group at the SIB Swiss Institute of Bioinformatics), who updated the HAMAP rules. This work was supported by Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA), the CNRS and the University of Evry Val d'Essonne.

Author contributions

V.d.B. conceived the project. V.d.B., K.B. and A.P. designed and supervised the project and analyzed the data. V.d.B. performed the genome analyses. A.P. designed and supervised the biochemical experiments with input from V.d.B. K.B. conceived and conducted the structural bioinformatics analysis with input from A.Z. A.P.-T., A.M., J.-L.P., C.B. and T.B. carried out the biochemical experiments. A. Debard, V.P. and M.B.-G. carried out the gene cloning, the protein expression and purifications for the whole collection of MetA and MetX enzymes. A.P. and E.D. designed and analyzed the metabolomics experiments, which were conducted by E.D., P.B. and T.B. C.V.-V. chemically synthesized reference compounds. K.B., A.P. and V.d.B. performed the taxonomic analysis, with input from D.V. and F.A. K.B. built the website with input from V.d.B. V.d.B., K.B. and A.P. wrote the manuscript with input from A. Danchin, M.S., A.Z., C.M., D.V. and J.W.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Additional information

Any supplementary information, chemical compound information and source data are available in the [online version of the paper](#). Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>. Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.d.B.

ONLINE METHODS

Chemicals and strains. L-homoserine, acetyl-CoA, succinyl-CoA, malonyl-CoA, glutaryl-CoA, propionyl-CoA and butyryl-CoA pyridoxal phosphate (PLP), Na₂S, L-cystathionine, L-cysteine, β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), isopropyl-β-D-thiogalactoside, L-lactate dehydrogenase and (*tert*-butoxycarbonyl)-L-serine were purchased from Sigma-Aldrich. Bovine serum albumin was purchased from Bio-Rad. Oligonucleotides were from Sigma-Genosys. *E. coli* strain BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL was from Agilent Technologies. Synthetic genes with optimized codons were provided by Genewiz via Sigma-Aldrich. All the strains listed in **Supplementary Data Set 1**, along with their identifiers, were purchased from DSMZ or ATCC.

Selection of candidate enzymes. Sequences identified from IPR005697 and IPR008220 were retrieved, and proteins were then selected from among the different taxonomy orders. In particular, the four MetX enzymes from Pseudomonadales (*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *P. aeruginosa* and *A. baylyi* ADP1) for which conflicting data are reported (**Supplementary Table 1**) were selected. Other taxa of γ-, δ- and ε-proteobacteria for which no MetX enzyme has been biochemically characterized so far were also considered. The multiple sequence alignment of MetA was done with the Clustal Omega program⁵¹. The simultaneous presence of *metX* and *metA* genes was rarely observed. The MetX counterpart of MetA_{ceruus} was thus investigated. Cases of fusion between MetX and MetW have been detected in a few species, mainly in the *Rhodopirellula* genus; thus *Rhodopirellula baltica* was chosen as a representative. Euryarchaeota species harboring a *metX* for which no experimental data are available. This prompted us to select diverse representatives from this phylum (halophiles, methanogens and thermoacidophilic strains). UniProtKB identifiers of the selected enzymes are reported in **Supplementary Data Set 1**.

Cloning and enzyme production. Primers were chosen and genes were cloned as described⁵. The forward primers introduced a hexahistidine tag in the N terminus of the proteins after the initial methionine, for purification purposes. Sequences were cloned in pET22b(+) (Novagen) modified for ligation-independent cloning. Specific extensions were added to the primers for cloning into the expression plasmid; all primers are reported in **Supplementary Data Set 1**. Gene amplification by PCR was done with DNA from strains purchased from DSMZ and ATCC (**Supplementary Data Set 1**), amplified with the Illustra GenomiPhi HY DNA amplification kit (GE Healthcare Life Sciences). Synthetic genes were cloned in the modified pET22b(+). All sequences were verified. When DNA samples corresponding to the gene encoding the selected enzyme were not available, PCR was carried out on the DNA of another strain from the same species as noted in **Supplementary Data Set 1**. In such cases, when the protein sequence or the strain was not identical to that of the selected enzyme, the sequence was deposited in the European Nucleotide Archive, and the new UniProt ID is reported in this study (**Supplementary Data Set 1**). Whenever *metW* was identified in the immediate vicinity of a selected *metX*, we attempted to clone *metX* and *metW* as a polycistronic sequence. The sequences of the resulting plasmids were verified. Genes that encode a cystathionine β-lyase (MetC_{ADP1}; UniProt Q6F7Q9) from ADP1 and two cystathionine γ-synthases from ADP1 (MetZ_{ADP1}; UniProt Q6FA16) and from *Bacillus subtilis* (MetI_{subtilis}; UniProt O31631) were cloned for the production of enzymes for the generic biochemical assay. Similarly, genes that encode the O-acyl-L-serine transferase Cys2 (UniProt Q10341) and the cysteine synthase Cys1a (SPBC36.04; UniProt O59701) from *S. pombe* DSM 70576 were cloned in the modified pET22b(+).

Mutagenesis. *A. baylyi* ADP1 and *H. influenzae metX* sequences were mutated for active site analysis with the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit from Agilent Technologies. The MetX_{ADP1} sequence was mutated (R323L) with the following primers: forward, GTCATTACCACCGAC TGGCTGTTGCACCAGAAAGAT-CCCAAG; reverse, CTTGGGATCTTT CTGGTGCAAACAGCCAGTCGGTGGTAAATGAC. The MetX_{influenzae} sequence was mutated (L306R) with the following primers: forward, GTTCTGTG-AC AACGGATCAACGTTTTAAACCCATTGATCTTTA; reverse, TAAAGATC AATGGGTTAAA-ACGTTGATCCGTTGTACAGAAAC. The corresponding mutant proteins were named MetX_{ADP1} R323L and MetX_{influenzae} L306R.

Expression and purification. Each expression plasmid was transformed into *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL. Cell culture, induction of protein production and cell lysis were conducted as previously described⁵. Purifications for MetC_{ADP1}, MetI_{subtilis}, MetZ_{ADP1}, Cys2_{pombe} and Cys1a_{pombe} were obtained from a 400-ml culture as described⁵². The ~100 candidate homoserine O-acyl transferases were purified with the Ni-NTA system according to the manufacturer's instructions (Qiagen) from 50-ml cell cultures. All purified proteins were stored at -80 °C. Samples were analyzed by SDS-PAGE with the NuPAGE system (Invitrogen). Protein concentrations were determined via the Bradford method, with bovine serum albumin as the standard (Bio-Rad).

Enzymatic assays. Generic assay for the determination of L-homoserine O-acyltransferase activity. L-Homoserine O-acyltransferase activity was monitored continuously after the oxidation of NADH that resulted from the coupling of MetA/MetX with the cystathionine γ-synthase MetZ_{ADP1} (specific to O-succinyl-L-homoserine) or MetI_{subtilis} that uses O-acetyl-L-homoserine, cystathionine β-lyase MetC_{ADP1}, and lactate dehydrogenase (LDH). An HST activity assay was conducted in the presence of 7.5 μg of MetZ_{ADP1}, 2.5 μg of MetC_{ADP1}, 76 U of LDH, and 300 μM succinyl-CoA. An HAT activity assay was conducted in the presence of 9.6 μg of MetI_{subtilis}, 2.5 μg of MetC_{ADP1}, 76 U of LDH, and 300 μM acetyl-CoA. All assays were carried out in 100 μl of activity buffer (50 mM Tris/HCl, pH 8.0) containing 10 mM L-homoserine, 1 mM L-cysteine, 20 μM PLP, 200 μM NADH. The reaction was initiated by the addition of the L-homoserine O-acyltransferase.

Kinetic characterization of the wild-type and mutant forms of MetX from *H. influenzae* and *A. baylyi* ADP1. HST and HAT activities were monitored via the generic assay described above, in the presence of 9 μg of MetZ_{ADP1} and 9.6 μg of MetI_{subtilis}, respectively. Assays were conducted in 100 μl of activity buffer containing 7.5 μg of MetC_{ADP1}, 76 U of LDH, 1 mM L-cysteine, 20 μM PLP, and 200 μM NADH. For assays, we varied the concentration of one substrate while maintaining a constant and saturating concentration of the second one.

Determination of the use of alternative acyl-CoAs. Assays were conducted in 100 μl of activity buffer containing 5 mM L-homoserine and 300 μM acyl-CoA (succinyl-CoA, malonyl-CoA, glutaryl-CoA, acetyl-CoA, propionyl-CoA, and butyryl-CoA). We determined reaction rates by monitoring the decrease in absorbance at 232 nm due to hydrolysis of the thioester bond of acyl-CoA ($\Delta_{\text{em}} = 4,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L-Serine O-acyltransferase activity. Specific activities were determined in 100 μl of activity buffer containing 5 mM amino acid (L-homoserine or L-serine) and 300 μM acyl-CoA (succinyl-CoA or acetyl-CoA). Kinetic constants of Cys2 (UniProt Q10341) from *S. pombe* (Cys2_{pombe}) were evaluated in 100 μl of activity buffer containing amino acid (L-homoserine or L-serine) and acyl-CoA (succinyl-CoA or acetyl-CoA). For assays, we varied the concentration of one substrate while maintaining a constant and saturating concentration of the second one. We determined reaction rates by monitoring the decrease in absorbance at 232 nm.

L-Cysteine synthase activity. Reactions were conducted in a coupled assay with succinic and acetic acid assay kits (Megazyme) that use pyruvate kinase and lactate dehydrogenase for the detection of succinic and acetic acid, respectively. L-cysteine synthesis from O-succinyl-L-serine and O-acetyl-L-serine was detected with succinyl-CoA synthetase and acetate kinase, respectively. We evaluated the kinetic constants of Cys1a_{pombe} (SPBC36.04; UniProt O59701) from *S. pombe* by varying the concentration of one substrate while maintaining a constant and saturating concentration of the other one. Reactions were triggered by 0.2 μg of Cys1a_{pombe} in 100-μl reaction mixtures (pH 8.4) containing 20 μM PLP. Na₂S was prepared in 10 mM NaOH. All enzymatic reactions were carried out at 25 °C in a SAFAS UVmc2 double-beam spectrophotometer. All kinetic parameters were determined from duplicate experiments by nonlinear analysis of initial rates with SigmaPlot version 9.0 (Systat Software).

Metabolome preparation. *S. pombe* metabolomes were prepared according to the protocol by Stuani *et al.*⁵³. The wild-type strain was DSM 70576, and the Δ*cys2* mutant (KP2990; h-leu1-32 *cys2*-1) was provided by YGRC/NBRP Japan (the Δ*cys2* mutant is named FY17212 in the YGRC/NBRP collection). The Δ*cys2* mutant was complemented with 500 μM leucine and 2 mM

cysteine. Briefly, cells were grown in liquid Edinburgh minimal medium (MP Biomedicals) at 28 °C under agitation. A saturated culture was diluted in a fresh liquid media at an OD₆₀₀ of 0.05 and further grown to an OD₆₀₀ of 0.2. We filtered 5 ml of this culture onto a 47-mm PTFE filter (0.45 μm) from Merck-Millipore. The filter was then positioned with cells on top on an agarose plate containing the same minimal media. Cells were grown to log phase (OD₆₀₀ ~0.8). We quenched metabolism by placing the filter containing the cells face-down in a glass dish containing 5 ml of a cold (−30 °C) mixture of 80% acetonitrile and 20% methanol. After 15 min at −30 °C, the filter coated with cells was subjected to mild sonication in an ultrasonic bath (Bronson 2510 Ultrasonic Cleaner) for 10 min at 4 °C to remove the cells from the filter. The quenching liquid containing the cells was transferred into a cryogenic vial and underwent six freeze–thaw cycles in liquid nitrogen/65 °C water to fully break the cells and extract the metabolites. The samples were lyophilized, dissolved in 200 μl of water and filtered through 0.22-μm filters (Millipore Millex-GV, 13 mm). The filter was then washed with 500 μl of 80/20 acetonitrile containing 10 mM ammonium formate (pH adjusted to 6.0 with formic acid). The resulting samples were immediately analyzed by LC–MS.

Metabolome analysis. Metabolite detection was done with two LC–MS systems that use the Ultimate 3000 Rapid Separation LC system (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Liquid chromatography was coupled with either an ultra-high-resolution Orbitrap Elite hybrid mass spectrometer (Thermo Scientific) or a QTRAP 5500 hybrid mass spectrometer (AB Sciex). Both mass spectrometers were equipped with electrospray ionization sources and were operated in positive and negative ionization modes.

HPLC separations were carried out on a ZIC-pHILIC column (100 × 2.1 mm², 5 μm, Merck) thermostated at 15 °C, with a flow rate of 200 μl/min. Phase A consisted of 10 mM ammonium formate (pH 6.0), and phase B consisted of acetonitrile. The gradient consisted of 80% B for 2 min, followed by an 8-min linear gradient to 40% B, and then an additional 4 min at 40% B. The system returned to the initial composition in 4 min, and re-equilibrated under these conditions for 12 min. The autosampler was kept at 4 °C, and 3 μl were injected.

For Orbitrap experiments, the resolving power was set at 60,000 *M/M* (full-width at half-maximum at *m/z* = 400); mass spectra were acquired over a range from *m/z* 50 up to *m/z* 1,000. Sheath gas and auxiliary gas flow rates were set at 60 arbitrary units (a.u.) and 50 a.u., respectively, and the drying gas temperature was set at 275 °C. The electrospray voltage was set at −4 kV in the negative ionization mode and at 4.2 kV in the positive mode. Raw data were analyzed with the Qual-browser module of Xcalibur version 2.2 (Thermo Scientific).

QTRAP experiments were conducted in multiple reaction monitoring mode with the following in-source parameters: ion source, 5.5 kV in positive mode and −4.5 kV in negative mode; curtain gas, 20 a.u.; temperature, 450 °C; gas 1, 45 a.u.; gas 2, 60 a.u. Extended method parameters and transitions for analyzed compounds are specified in **Supplementary Table 10**. Three transitions were recorded for each compound. Data were analyzed with Analyst software (AB Sciex).

Synthesis of reference standards. All reagents were purchased from commercial sources and used without additional purification. NMR spectra were recorded on a Bruker 500-MHz spectrometer from Institut de Chimie des Substances Naturelles (France) or a 600-MHz spectrometer from Université d'Evry Val d'Essonne (France). Chemical shifts (expressed in p.p.m.) of ¹H and ¹³C NMR spectra were referenced to the solvent peaks δ(H) = 7.26 and δ(C) = 77.3 for CDCl₃, and δ(H) = 4.79 for D₂O. Thin-layer chromatography (TLC) was done with aluminum-backed sheets with silica gel 60 F254 (Merck). Column chromatography was carried out on a CombiFlash Companion with Redised Rf cartridges.

Synthesis of *N*-succinyl-L-serine. *N*-succinyl-L-serine was synthesized according to a previously published protocol⁵⁴.

Synthesis of *O*-succinyl-L-serine ((*S*)-4-(2-amino-2-carboxyethoxy)-4-oxobutanoic acid). (*S*)-4-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-carboxyethoxy)-4-oxobutanoic acid (*N*-Boc-*O*-succinyl-L-serine). To a stirred solution of (*tert*-butoxycarbonyl)-L-serine (9.75 mmol, 1 equiv., 2.0 g), dried pyridine

(500 μl), and *N,N*-dimethylpyridin-4-amine (0.98 mmol, 0.1 equiv., 119 mg) in dried dichloromethane (100 ml), we added dropwise under inert atmosphere a solution of succinic anhydride in dried tetrahydrofuran (14 ml). After stirring for 16 h at room temperature, the reaction mixture was concentrated under reduced pressure to a volume of about 15 ml and diluted with ethyl acetate (70 ml) and water (20 ml). The pH was adjusted to 8.5 with saturated sodium hydrogen carbonate, and the separated aqueous phase was acidified to pH 3 with a 2 N solution of hydrogen chloride and extracted with ethyl acetate (4 × 30 ml). The combined organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered, and concentrated to dryness under reduced pressure. Purification of the product by flash chromatography on silica gel (gradient mode: dichloromethane with 0.25% formic acid/methanol with 0.25% formic acid 99.5/0.5 to 90/10 in 10 min) afforded the desired (*S*)-4-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-carboxyethoxy)-4-oxobutanoic acid as oily solids; the yield was 1.56 g (53%). TLC (CH₂Cl₂:MeOH + 0.25% HCO₂H, 90:10 vol/vol), *R*_f = 0.58; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz), δ = 9.47 (s, 2H, CO₂H), 5.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, NH), 4.33–4.63 (m, 3H, COCHCH₂O), 2.64–2.67 (m, 4H, HO₂CCH₂CH₂CO), 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), δ = 177.6, 174.4 and 171.5 (HO₂C and OCOCH₂), 155.4 (NHCOOC(CH₃)₃), 80.8 (C(CH₃)₃), 64.7 (COCHCH₂O), 52.8 (COCHCH₂O), 29.0 and 28.9 (HO₂CCH₂CH₂CO), 28.3 (C(CH₃)₃). HRMS (*m/z*), [M-H]⁺ calculated for C₁₂H₁₈NO₈, 304.10379; found 304.10329.

(*S*)-4-(2-amino-2-carboxyethoxy)-4-oxobutanoic acid (*O*-succinyl-L-serine) (hydrochloride salt) synthesis. To a stirred solution of (*S*)-4-(2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-2-carboxyethoxy)-4-oxobutanoic acid (1.99 mmol, 1 equiv., 610 mg) in dried dichloromethane (2 ml) and ethyl acetate (2 ml) cooled to 10 °C, we added 2 N hydrogen chloride in diethyl ether (10 mmol, 5 equiv., 5 ml) dropwise. After stirring for 6.5 h at room temperature, the heterogeneous reaction mixture was filtered and the solids were washed with ethyl acetate to afford a pure hydrochloride salt of (*S*)-4-(2-amino-2-carboxyethoxy)-4-oxobutanoic acid as white solids; the yield was 366 mg (76%). ¹H NMR (D₂O, 600 MHz), δ = 4.63 and 4.58 (m, 2H, COCHCH₂O), 4.41 (m, 1H, COCHCH₂O), 2.71 (m, 4H, HO₂CCH₂CH₂CO); ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz), δ = 176.8, 174.0 and 169.3 (HO₂C and OCOCH₂), 62.2 (COCHCH₂O), 52.3 (COCHCH₂O), 28.5 (HO₂CCH₂CH₂CO). HRMS (*m/z*), [M-H]⁺ calculated for C₇H₁₀NO₆, 204.05136; found 204.05118.

ASMC. ASMC was used as previously described²⁶. We built a model for each sequence of a family by homology modeling. All the experimentally determined structures of the family were used as templates. First, each sequence was aligned to a multiple structure template alignment, with the use of a structure-dependent gap penalty. Second, we modeled the target sequence by using the combination of the templates structures. This last step ensured that the alignment from the previous step was robust and that the packing in three dimensions did not cause steric clashes (i.e., it estimated the probability of the alignment). All models of the family were then structurally aligned to a reference structure. Residues aligned with the active site of the reference structure were extracted and linearly projected to form a structure-based sequence alignment, which was subsequently subjected to conceptual sorting clustering.

Classification of the *MetX* family. All the members of the homoserine acetyltransferase InterPro IPR008220 family were collected in January 2016 (5,492 sequences) and clustered using 100% similarity on the overall sequence to produce a nonredundant set of 4,510 proteins. Only proteins sharing at least 25% sequence identity with at least one *MetX* enzyme for which a structure was available were kept (see the next paragraph). In total, 4,280 proteins were used for active site classification with ASMC software²⁶. We began by building homology models, using as templates the crystallographic structures of proteins of the InterPro IPR008220 set: *MetX* from *H. influenzae* (PDB 2B61), *Leptospira interrogans* (PDB 2PL5), *Bacillus anthracis* (PDB 3111), *Acremonium chrysogenum* (PDB 2VAX), *Staphylococcus aureus* (PDB 4QLO), *Corynebacterium glutamicum* (PDB 5D6O) and *Streptomyces lavendulae* subsp. *lavendulae* (PDB 3VVV). None of these structures was determined in the presence of a substrate. Out of the 14 predicted pockets, we selected the one that contained the catalytic residues Ser143 and His337. The third one, Asp304, is buried under His337 and was thus not taken into account in the definition of the pocket, which was the largest found by Fpocket. Out of the 38 residues

that composed this pocket, we kept those in which the C α atom was less than 12.5 Å from the catalytic serine. This distance corresponds to the length of an extended succinyl moiety (about 4 Å) plus that of the longest side chain of the active site amino acids (i.e., Arg212; about 5.5 Å), plus 3 Å (which corresponds to the average distance of separation of two nonbonding atoms in interaction). In total, the reference pocket was composed of 21 residues. Finally, the 4,280 models were structurally aligned on the MetX_{influenzae} structure. Residues aligned with the 21 pocket residues from MetX_{influenzae} were extracted to form a multiple sequence alignment. WEKA was then used to generate a hierarchical tree of active sites. We defined the ASMC groups by cutting the tree of active sites at the root node.

Classification of the MetA family. All the members of the homoserine acetyltransferase InterPro IPR005697 family were collected in January 2016 (3,946 sequences) and clustered using 100% similarity on the overall sequence to produce a nonredundant set of 2,761 proteins. The 2,662 proteins that had at least 25% sequence identity with at least one MetA crystallographic structure were used for ASMC calculations. We built homology models, using as templates the crystallographic structure of MetA_{cereus} in complex with L-homoserine (PDB 2VDJ), and homoserine O-succinyltransferase *T. maritima* (PDB 2H2W). The selected pocket was the one containing L-homoserine in the crystallographic structure of MetA_{cereus}. The catalytic Glu237, buried under His235, was not considered as an accessible residue of the pocket. We kept the pocket residues for atoms that were located less than 6 Å from any of the L-homoserine atoms in the crystallographic structure of MetA_{cereus}. In total, the pocket was composed of 18 residues. The 2,662 models were structurally aligned on the structure from MetA_{cereus} and subjected to WEKA clustering. We defined the ASMC groups by cutting the tree of active sites at the root node.

Models of the acetylated/succinylated enzymes. First, the homology models from *A. baylyi* MetX-G2 (UniProt Q6FEQ3) and *E. coli* MetA-G3 (UniProt A1AII3), along with the structures from *H. influenzae* MetX-G1 (PDB 2B61) and *B. cereus* MetA-G1 (PDB 2VDJ), were energy-minimized using the Steepest Descent energy-minimization technique in the MMTK routine from Chimera software⁵⁵. AMBER parameters were used for standard residues. Antechamber, the general AMBER force field, was used to assign partial charges. The maximum number of steps was fixed at 5,000. All of the atoms of the enzyme were allowed to move.

Acetyl-CoA was docked on *H. influenzae* MetX-G1 and *B. cereus* MetA-G1, and succinyl-CoA was docked on *E. coli* MetA-G3 and ADP1 from MetX-G2 using Autodock Vina software⁵⁶. Gasteiger charges and nonpolar hydrogen atoms were added with AutoDockTools. Side chain protonation states assumed a negative charge for aspartate and glutamate, and a positive one for lysine. The docking grid encompassed the pocket defined by Fpocket software for MetX or by the crystallographic structure for MetA (see above). Docking simulations were run until a configuration was found in which the acyl-CoA sulfur atom was within 6 Å of the side chain oxygen atom of the catalytic serine for MetX_{ADP1} and MetX_{influenzae}, or less than 6 Å from the sulfur atom of the catalytic cysteine for MetA_{coli} or MetA_{cereus}. Then, the CoA pantothenic chain was cut and removed. The remaining acyl moiety was artificially linked to the catalytic serine for MetX_{ADP1} and MetX_{influenzae} or cysteine for MetA_{coli} and MetA_{cereus}. The four modified enzymes were then subjected to energy minimization as described above with distance restraints from Gromacs⁵⁷ to force covalent bonding between the acyl moiety and the catalytic serine or cysteine. This modeling protocol was repeated with different rotamers of the catalytic serine for MetX-G2_{ADP1} and MetX-G1_{influenzae}. For the acylated model of MetA_{coli} or MetA_{cereus}, the rotamer chosen for the catalytic cysteine was the one found in the crystallographic structure of *T. maritima* MetA (PDB 2H2W). To build the acetylated *Methylococcus capsulatus* MetA-G4 (UniProt Q606Y5) and succinylated *Frateuria aurantia* MetX-G3 (UniProt H8L374) models, we structurally aligned their models with the models of succinylated MetA_{coli} and

succinylated MetX_{ADP1}, respectively. The modified acylated catalytic serine and cysteine were transferred to MetX_{aurantia} and MetA_{capsulatus}, respectively. The modified enzymes were finally subjected to energy minimization. The acyl intermediate enzyme models are available for download at <http://www.genoscope.cns.fr/metgenes/>.

Taxonomic analysis. The proteome identifier (UniProt ID) and the NCBI taxonomic identifier (TaxID) were retrieved from UniProt for each accession of the InterPro sets. The cladograms were built with the ETE2 toolkit and drawn with iTOL (Fig. 1) or GraphAn (Fig. 5). First, for each TaxID associated with a sequence, the NCBI taxonomy lineage was parsed with the ETE2 NCBI Taxa class. The ranks corresponding to superkingdom, phylum, class, order, family and genus were kept. The redundancy lineages were removed. Next, we built the taxonomic diagram by assembling these six ranks. Then we calculated the number of species found in the InterPro sets and belonging to each genus. The cladogram in Figure 5 was built with proteins associated with organisms with completely sequenced genomes (indicated in the UniProt entries), modeled proteins, and proteins that have catalytic and homoserine binding residues. The cladograms in Supplementary Figure 2 were built with all proteins from the InterPro sets.

Data availability. The following nucleotide sequences of genes that were cloned in this study were deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) and assigned Swiss-Prot accession numbers: *metX* from *Caulobacter crescentus* DSM 4727 (ENA LT613642; UniProt A0A1D3PCK0), *Neisseria gonorrhoeae* DSM 9198 (ENA LN871225; UniProt A0A0I9QGZ7), *Stenotrophomonas maltophilia* DSM 50170 (ENA LN871226; UniProt A0A0I9RJ56), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* DSM 3586 (ENA LT613641; UniProt A0A1D3PD87) and *Selenomonas noxia* DSM 19578 (ENA LT613644; UniProt A0A1D3PD14); *metA* from *Citrobacter koseri* DSM 4595 (ENA LN871221; UniProt A0A078LMN5), *Sodalis glossinidius* DSM 16929 (ENA LN871222; UniProt A0A0I9QJG3), *Geobacillus kaustophilus* DSM 7263 (ENA LN871223; UniProt A0A0D8BWP6), *Leuconostoc citreum* DSM 5577 (ENA LN871224; UniProt A0A0I9QIC9), *Rhodopseudomonas palustris* DSM 123 (ENA LT613636; UniProt A0A1D3PCI9), *Bradyrhizobium japonicum* DSM 30131 (ENA LT613637; UniProt A0A1D3PCJ5), *Bacillus clausii* DSM 8716 (ENA LT613638; UniProt A0A1D3PDD4), *L. acidophilus* DSM 20079 (ENA LT613639; UniProt A0A1D3PCK2), *Shewanella baltica* DSM 9439 (ENA LT613640); and CysA from *A. nidulans* DSM 820 (ENA LT613643; UniProt A0A1D3PCM3). The acyl intermediate enzyme models are available for download at <http://www.genoscope.cns.fr/metgenes/>. All other data supporting the findings of this study that are not included in the main text can be found in the associated supplementary files or are available from the corresponding author upon reasonable request.

- Sievers, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539 (2011).
- Kreimeyer, A. *et al.* Identification of the last unknown genes in the fermentation pathway of lysine. *J. Biol. Chem.* **282**, 7191–7197 (2007).
- Stuani, L. *et al.* Novel metabolic features in *Acinetobacter baylyi* ADP1 revealed by a multiomics approach. *Metabolomics* **10**, 1223–1238 (2014).
- Sakai, A. *et al.* Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: N-succinylamino acid racemase and a new pathway for the irreversible conversion of D- to L-amino acids. *Biochemistry* **45**, 4455–4462 (2006).
- Pettersen, E.F. *et al.* UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612 (2004).
- Trott, O. & Olson, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461 (2010).
- Hess, B., Kutzner, C., van der Spoel, D. & Lindahl, E. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J. Chem. Theory Comput.* **4**, 435–447 (2008).

CORRIGENDUM

Parallel evolution of non-homologous isofunctional enzymes in methionine biosynthesis

Karine Bastard, Alain Perret, Aline Mariage, Thomas Bessonnet, Agnès Pinet-Turpault, Jean-Louis Petit, Ekaterina Darii, Pascal Bazire, Carine Vergne-Vaxelaire, Clémence Brewee, Adrien Debard, Virginie Pellouin, Marielle Besnard-Gonnet, François Artiguenave, Claudine Médigue, David Vallenet, Antoine Danchin, Anne Zapparucha, Jean Weissenbach, Marcel Salanoubat & Véronique de Berardinis

Nat. Chem. Biol. **13**, 858–866 (2017); published online 5 June 2017; corrected after print 10 July 2017

In the version of this article initially published, a sentence in the abstract, “Members of these families are prone to incorrect annotation because MetA and MetX enzymes are assumed to always use acetyl-CoA and succinyl-CoA, respectively,” had the order of enzymes MetA and MetX reversed. The sentence should read, “Members of these families are prone to incorrect annotation because MetX and MetA enzymes are assumed to always use acetyl-CoA and succinyl-CoA, respectively.” The error has been corrected in the HTML and PDF versions of the article.

Titre : Exploration expérimentale du métabolisme du soufre dans le vivant

Mots clés : *O*-succinyl-L-sérine (SST) ; L-méthionine ; L-cystéine ; *Acinetobacter baylyi* ADP1 ; métabolisme

Résumé : *Acinetobacter baylyi* ADP1 (ADP1), une bactérie du sol aux capacités de dégradation des molécules aromatiques remarquables est utilisée au laboratoire comme organisme modèle pour l'élucidation de nouvelles fonctions enzymatiques et voies métaboliques. Tirant profit de deux qualités d'ADP1 (compétence naturelle et recombinaison homologue efficace), une collection complète de mutants knock-out a été obtenue. L'analyse de cette ressource génomique a fait apparaître des phénotypes non prédits par l'annotation aboutissant notamment à l'initiation de l'étude du métabolisme du soufre chez ADP1 avec deux axes : (1) la biosynthèse de la L-méthionine (L-Met) et plus spécialement l'étude des familles d'enzymes non homologues MetX et MetA catalysant l'acylation de l'homosérine dans le monde vivant, première étape de cette voie ; (2) le recyclage de la L-méthionine et les voies d'assimilation des molécules soufrées. La thèse s'inscrit dans ces deux thématiques. Tout d'abord, un vaste projet combinant criblage expérimental et analyse structurale des sites actifs de MetA et MetX avait permis précédemment d'identifier les résidus déterminant l'usage de l'acyl-CoA et de proposer des règles précises de prédiction de fonction pour ces deux familles finalement isofonctionnelles. Cette étude avait révélé entre autres que 10% des MetX n'étaient pas impliqués dans la biosynthèse de L-Met. Nous avons donc entrepris la caractérisation de ces paralogues à l'activité inédite L-sérine *O*-succinyltransférase (SST) et finalement impliquées dans la biosynthèse de la L-cystéine (L-Cys). Jusqu'alors, l'acétylation par les L-sérine *O*-acétyltransférases (SAT) était le seul moyen connu d'activer la L-sérine. La détermination des paramètres cinétiques des SST ainsi que la caractérisation par LCMS *in vitro* puis la détection *in vivo* d'*O*-succinyl-L-sérine (OSS) dans les métabolomes de la levure *Schizosaccharomyces pombe* et la bactérie *Xanthomonas campestris* ont permis de démontrer la fonction de ces paralogues. Pour compléter la démonstration, la caractérisation des cystéine synthases (CysK) respectives a montré qu'elles effectuent en effet la sulfhydrylation de l'OSS pour former de la L-Cys. Notre étude a ainsi également révélé que la voie décrite de la biosynthèse de la L-cystéine chez les levures jusqu'alors extrapolée à partir de la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae* (voie de transsulfuration réverse) était en réalité une exception et que la grande majorité des levures synthétisent la L-Cys à partir de la L-sérine via ce nouveau métabolite, l'OSS. Cette thèse, dans un deuxième temps, a initié l'exploration expérimentale des voies d'assimilation du soufre chez ADP1 chez qui notamment aucune voie de recyclage de la L-Met n'était prédite alors qu'elle y est source de soufre. Combinant des approches complémentaires (génétique inverse par phénotypage de la collection complète de mutants sur diverses sources de soufre, transcriptomique sur L-Met et L-Cys versus sulfate, criblage des enzymes à PLP d'ADP1 potentiellement impliquées, étude biochimique des candidats et construction de mutants d'ADP1), une image assez précise des voies d'assimilation de diverses sources de soufre se dessine. Par exemple, les voies d'assimilations de la L-Met et du DMSP semblent aboutir à la production de sulfite via la synthèse de méthanesulfonate sous le contrôle du régulateur transcriptionnel CBL. De plus, le KMBA et le méthaneithiol sont probablement des intermédiaires de la voie de recyclage de la L-Met, alors que le DMSO et le DMSO₂ semblent être des intermédiaires cataboliques uniquement pour le DMSP.

Title : Experimental exploration of the sulfur metabolism in living organisms

Keywords : *O*-succinyl-L-serine (SST) ; L-methionine ; L-cysteine ; *Acinetobacter baylyi* ADP1 ; metabolism

Abstract : *Acinetobacter baylyi* ADP1 (ADP1), a soil bacterium with remarkable aromatic molecule degradation capacities is used in the laboratory as a model organism for the elucidation of new enzymatic functions and metabolic pathways. Taking advantage of two qualities of ADP1 (natural competence and effective homologous recombination), a complete collection of knock-out mutants has been obtained. Analysis of this genomic resource revealed unpredicted phenotypes by the annotation, leading in particular to the initiation of the study of sulphur metabolism in ADP1 with two axes: (1) the biosynthesis of L-methionine (L-Met) and more specifically the study of the families of non-homologous MetX and MetA enzymes catalysing the acylation of homoserine, the first step of this pathway; (2) the recycling of L-methionine. The thesis falls within these two themes. First, a vast project combining experimental screening and structural analysis of the active sites of MetA and MetX had previously made it possible to identify the residues determining the use of acyl-CoA and to propose precise function prediction rules for these two finally isofunctional families. Among other things, this study revealed that 10% of MetX were not involved in L-Met biosynthesis. We have therefore undertaken the characterization of these paralogues with novel activity L-serine *O*-succinyltransferase (SST) and finally involved in the biosynthesis of L-cysteine (L-Cys). Until then, acetylation by L-serine *O*-acetyltransferases (SAT) was the only known way to activate L-serine. The determination of kinetic parameters of SST as well as *in vitro* LCMS characterization and *in vivo* detection of *O*-succinyl-L-serine (OSS) in the metabolomes of *Schizosaccharomyces pombe* yeast and *Xanthomonas campestris* bacterium demonstrated the function of these paralogues. To complete the demonstration, the characterization of the respective cysteine synthases (CysK) showed that they indeed perform sulfhydrylation of OSS to form L-Cys. Our study also revealed that the described pathway of L-cysteine biosynthesis in yeasts hitherto extrapolated from the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* (reverse transsulfuration pathway) was actually an exception and that the vast majority of yeasts synthesize L-Cys from L-serine via this new metabolite, OSS. This thesis, in a second stage, initiated the experimental exploration of sulphur assimilation pathways in ADP1, in which no L-Met recycling pathway was predicted even though it is a source of sulphur. Combining complementary approaches (reverse genetics by phenotyping the complete collection of mutants on various sulphur sources, transcriptomics on L-Met and L-Cys versus sulphate, screening of ADP1 PLP enzymes, biochemical study of ADP1 candidates and mutants), a fairly accurate picture of the assimilation pathways of various sulphur sources is emerging. For example, the assimilation pathways of L-Met and DMSP appear to lead to the production of sulphite via methanesulphonate synthesis under the control of the transcriptional regulator CBL. In addition, KMBA and methanethiol are probably intermediates in the L-Met recycling pathway, whereas DMSO and DMSO₂ appear to be catabolic intermediates only for DMSP.

