



HAL
open science

Étude fonctionnelle et structurale des transférases de la famille Fem de *Staphylococcus aureus*

Lauriane Rietmeyer

► **To cite this version:**

Lauriane Rietmeyer. Étude fonctionnelle et structurale des transférases de la famille Fem de *Staphylococcus aureus*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS360 . tel-03935194

HAL Id: tel-03935194

<https://theses.hal.science/tel-03935194v1>

Submitted on 11 Jan 2023

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale 515, Complexité du Vivant

Structures bactériennes impliquées dans la modulation de la résistance aux antibiotiques

Centre de recherche des Cordeliers, UMRS 1138, Equipe 12

Etude fonctionnelle et structurale des transférases de la famille Fem de *Staphylococcus aureus*

Par Lauriane Rietmeyer

Thèse de doctorat de Biochimie et Biologie structurale

Dirigée par Matthieu Fonvielle et Mélanie Ethève-Quelquejeu

Présentée et soutenue publiquement le 2 décembre 2022

Devant un jury composé de :

Pr. Nicolas Biais, Sorbonne Université

Président

Dr. Magali Frugier, CNRS, Université de Strasbourg

Rapporteur

Dr. Mohammed Terrak, Université de Liège

Rapporteur

Dr. Hélène Barreteau, Université Paris-Saclay

Examinatrice

Dr. Matthieu Fonvielle, INSERM

Directeur de thèse

Pr. Mélanie Ethève-Quelquejeu, Université Paris Cité

Directrice de thèse

Remerciements

Je voudrais tout d'abord commencer par remercier les membres de mon jury Mme. Frugier, M. Terrak, Mme. Barreteau et M. Biais qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse ainsi que Michel Arthur de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je souhaite également remercier tous les collaborateurs ayant participé à ces travaux de recherche : l'équipe cristallographes de Herman Van Tilbeurgh, et en particulier Inès (I2BC), l'équipe de Thierry Touzé (I2BC), les chimistes de l'équipe de Mélanie Etheve-Quelquejeu (Université Paris Cité), Piet Herdewyn et Guy Schepers (Rega Institute), ainsi que Paloma Fernandez-Varela (I2BC).

Je tenais ensuite à remercier tout particulièrement mes co-directeurs de thèse Mélanie et Matthieu. Mélanie, merci pour ta gentillesse et ta bienveillance tout au long de cette thèse. Un mot pour toi Matthieu, qui je pense sais déjà tout, mais saches que tu as été un directeur de thèse formidable. J'ai beaucoup appris à tes côtés et tu as été d'un soutien sans faille durant ces 3 années pleines de rebondissements. Merci, à vous pour tout.

Je souhaite également remercier tous les membres du laboratoire avec qui j'ai eu le plaisir de discuter et de partager.

Grazyna, merci pour ton aide précieuse, ta super cuisine, et tes éclats de voix mémorables nous permettant de filer droit au laboratoire.

Constantin, merci pour ta bonne humeur permanente, mais surtout pour tes blagues (la vengeance sera terrible ;)).

Nicolas petit mot spécialement pour toi, qui m'a guidé à mon arrivée au laboratoire et qui a formé la « stagiaire ».

Guennadi, ou plutôt Professeur Sezonov, je te remercie de m'avoir guidée pendant mes deux années de Master et de m'avoir aidée à trouver cette thèse. Tu es un professeur passionné, qui transmet son savoir avec tant de facilité. Les futurs étudiants qui croiseront ta route ont une chance extraordinaire.

A ces collègues qui deviennent des ami(e)s.

Inès et Delphine, mes rayons de soleil du laboratoire, mes piliers durant cette aventure qu'a été la thèse. A toutes nos discussions, nos sorties et nos fous rires mémorables.

Inès, ma poulette, tu es une des personnes les plus gentilles que j'ai pu rencontrer sur ma route. Toujours si bienveillante, et de si bon conseil. Merci d'être toi.

Delphine, la maman de notre trio, qui fait pourtant la fête bien mieux que nous. Merci pour tout ton travail. Je te souhaite d'être heureuse dans ta nouvelle vie (garde une chambre pour nous à Rennes ;)). Tu es exceptionnelle.

Heiner, mon camarade de bureau, jusqu'à ce qu'Inès prenne ta place ;) Ton aide m'a été précieuse, tu es quelqu'un de génial et tu as tant à apporter aux autres.

A tous ces ami(e)s importants qui étaient déjà dans notre vie et qui le resteront, Ethan, Héloïse, merci d'être là depuis si longtemps et de me soutenir quoi qu'il advienne.

Et enfin, merci à mes parents, mon frère William et mes grands-mères de m'avoir tant aimée et tant soutenue tout au long de la thèse et de la vie. Il est souvent dit qu'on ne choisit pas sa famille mais ses amis. Sachez que si j'avais à choisir, je vous choiserais à chaque fois.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	1
Liste des figures	2
Liste des tableaux	4
INTRODUCTION	5
1. Les antibiotiques	5
1.1. Mode d'action des antibiotiques.....	5
1.2. Résistances des bactéries aux antibiotiques	5
2. Le peptidoglycane	8
2.1. La paroi bactérienne.....	8
2.2. Structure et variabilité du peptidoglycane.....	9
2.3. Synthèse du peptidoglycane	11
2.3.1. Phase cytoplasmique.....	12
2.3.2. Phases membranaires : synthèse des intermédiaires lipidiques	15
2.3.3. Transport du lipide à travers la membrane.....	19
2.3.4. Polymérisation du peptidoglycane.....	20
2.4. Recyclage et turnover du peptidoglycane.....	21
2.5. Molécules inhibant la synthèse du peptidoglycane	21
2.5.1. Inhibiteurs de l'étape de polymérisation du PG.....	21
2.5.2. Molécules ciblant les lipides.....	22
2.5.3. La fosfomycine.....	22
3. Les aminoacyl transférases de la famille Fem	23
3.1. Comparaison de structure des aminoacyl transférases de la famille Fem.....	23
3.2. Diversité des transférases de la famille Fem.....	25
3.2.1. MurM et MurN de <i>S. pneumoniae</i>	25
3.2.2. FemX, FemY et VanK de <i>Streptomyces coelicolor</i>	25
3.2.3. BppA1 et BppA2 de <i>E. faecalis</i>	26
3.2.4. Transférase de la famille Fem chez le genre <i>Borrelia</i>	26
3.2.5. FemX chez <i>W. viridescens</i> : Fem modèle ne possédant pas de domaine coiled-coil	27
3.2.6. Les transférases de la famille Fem chez <i>S. aureus</i>	29
3.3. Inhibiteurs des transférases de la famille Fem.....	34
3.3.1. Inhibiteur mimant l'intermédiaire réactionnel de haute énergie.....	34
3.3.2. Analogues de substrats	35
3.3.3. Inhibiteur de type bi-substrat.....	36

4.	Les ARN de transfert (ARNt)	38
4.1.	Structure des ARNt	38
4.2.	Synthèse des ARNt chez les procaryotes.....	39
4.3.	Modifications post-transcriptionnelles	40
4.4.	Aminoacylation des ARNt.....	42
4.5.	Réactivité des ARNt aminoacylés	43
4.6.	Reconnaissance des ARNt aminoacylés par la machinerie de traduction.....	43
5.	Objectifs de la thèse	46
MATERIELS ET METHODES		48
1.	Surexpression et purification des protéines à His-Tag.....	48
1.1.	FmhB, FmhB C ^{70S} , FmhB C ^{70S} L ^{206T} , FemA et FemB de <i>S. aureus</i>	48
1.2.	Extrait cellulaire contenant MurT/GatD de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	49
2.	Synthèse <i>in vitro</i> d'analogues solubles du lipide II.....	49
2.1.	Extraction et purification du précurseur de l'UDP-MurNAc-pentapeptide (UM5K) à partir d'un extrait bactérien.....	49
2.2.	Synthèse de l'UM5K possédant 1 à 5 glycines au niveau de la chaîne latérale	50
2.3.	Synthèse des UM5K possédant un groupement glycol ou malonate en position terminale de la chaîne latérale	50
2.4.	Synthèse <i>in vitro</i> des lipide II à C ₁₀ par un système enzymatique couplé MraY/MurG	51
2.5.	Synthèse <i>in vitro</i> des intermédiaires amidés du lipide II.....	51
3.	Synthèse de molécule bi-substrat pour FmhB	52
3.1.	Partie ARN	52
3.2.	Synthèse de l'UM5K et du lipide II C ₁₀ à thio-alcyne	52
3.3.	Synthèse du BS	53
4.	Test cinétiques.....	53
4.1.	Détermination des TO de FmhB, FemA et FemB de <i>S. aureus</i>	53
4.2.	Détermination de l'activité <i>in vitro</i> de FmhB, FemA et FemB dans un essai enzymatique couplé	55
4.3.	Détermination de constantes catalytiques par modélisation avec COPASI.....	56
4.4.	Test d'inhibition des transférases Fem	56
5.	Conditions cristallogénèse de FmhB	57
5.1.	Cristallisation avec le lipide	57
5.2.	Cristallisation avec les BS 1 et BS 2.....	57

RESULTATS	59
CHAPITRE I : Publication 1	59
Partition des isoaccepteurs ARNt ^{Gly} entre les voies de synthèse des protéines et du peptidoglycane chez <i>S. aureus</i>	59
CHAPITRE II : Etude de la spécificité des transférases de la famille Fem de <i>S. aureus</i> pour leurs substrats lipidiques (lipides II)	77
1. Hémi-synthèse de substrats lipidiques solubles	77
2. Activité des transférases Fem	79
3. Dynamique <i>in vitro</i> des transférases Fem	82
4. Impact de l'amidation sur l'activité de chaque enzyme.....	86
4.1. FmhB.....	86
4.2. FemA.....	87
4.3. FemB.....	88
5. Coopérativité des transférases Fem.....	90
6. Inhibition de FmhB par les différents intermédiaires lipidiques.....	91
CHAPITRE III : Etude structurale des transférases de la famille Fem	100
1. Prédiction de structure avec Alphafold2.....	100
1.1. FemA de <i>S. aureus</i>	101
1.2. FemB de <i>S. aureus</i>	102
2. Comparaison de structure des trois principales Fem transférases de <i>S. aureus</i>	103
2.1. Organisation structurale.....	103
2.2. Site catalytique	104
3. Co-cristallisation de FmhB C ⁷⁰ S L ²⁰⁶ T avec un analogue de lipide II soluble.....	107
3.1. Environnement des sucres, du PPi et du motif diprényl	109
3.2. Environnement de la L-Ala ¹ du D-iGlu ²	110
3.3. D-Ala ⁴ et la D-Ala ⁵ terminale.....	111
3.4. Environnement de la L-Lys ³	111
4. Co-cristallisation avec des bi-substrats	113
4.1. Synthèse des inhibiteurs bi-substrats	114
4.2. Affinité de FmhB pour les bi-substrats.....	116
4.3. Co-cristallisation de FmhB C ⁷⁰ S L ²⁰⁶ T avec une molécule bi-substrat.....	117
4.3.1. Environnement du MurNAc et du PPi	120
4.3.2. Environnement de la L-Ala ¹ et du D-iGlu ²	122

4.3.3.	Positionnement de la L-Cys ³	123
4.3.4.	Environnement du dipeptide D-Ala ⁴ -D-Ala ⁵ terminal.....	124
4.3.5.	Site probable de fixation du triazole et de l'ARN du BS 1	125
CHAPITRE IV : Publication 2		128
Les acides xéno nucléiques comme substrats ou inhibiteurs de FemX de <i>W. viridescens</i>		128
Bi-substrats à XNA ciblant FmhB		141
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		143
1.	Impact des modifications post-transcriptionnelles des Gly-ARNt ^{Gly}	143
2.	Mécanisme enzymatique des transférases Fem	145
3.	Modèle de régulation de la synthèse du peptidoglycane	147
4.	Développement de molécules antibactériennes ciblant les transférases Fem.....	150
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		151

Liste des abréviations

ARNt	ARN de transfert
ARNt NP	ARNt non protéogénique
ARNt P	ARNt protéogénique
aa-ARNt^{aa}	ARN de transfert aminoacylé
aaRS	Aminoacyl-ARNt-synthétase
BS	Bi-substrat
C₅₅	Motif undecaprenyl
C₁₀	Motif diprenyl
D	Dihydrouridine
D-iGln	D-iso-glutamine
D-iGlu	D-iso-glutamate
D-Lac	D-lactate
EF-Tu	E longation F actor T hermo U nstable
Fem	F actors E ssential for M ethicillin resistance
GlcNAc	<i>N</i> -acétylglucosamine
Lipide I	MurNAc-(pentapeptide)-pyrophosphoryl undecaprenol
Lipide II	GlcNAc-MurNAc-(pentapeptide)-pyrophosphoryl undecaprenol
LPS	Lipopolysaccharides
mo⁵U	5-methoxyuridine
MurNAc	Acide <i>N</i> -acétylmuramique
PAE	P redicted a ligned e rror
PG	Peptidoglycane
pIDDT	P redicted l ocal d istance d ifference t est
PLP	Protéine de liaison à la pénicilline
PPi	Pyrophosphate
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
s⁴U	4-thiouridine
TO	Turn over
UDP-GlcNAc	UDP- <i>N</i> -acétylglucosamine
UM5K	UDP-MurNAc-pentapeptide
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine
Ψ	Pseudouridine

Liste des figures

Figure 1 : Mécanismes d'actions et de résistances aux antibiotiques.	6
Figure 2 : Schéma des différents types de parois bactériennes.....	9
Figure 3 : Structure et variabilité du PG.	10
Figure 4 : Exemple de synthèse du PG chez <i>S. aureus</i> , bactérie à Gram positif.....	11
Figure 5 : Etapes cytoplasmiques de la synthèse du PG menant à la formation de l'UM5K.	12
Figure 6 : Mécanisme catalytique des enzymes de la superfamille des Mur ligases.	14
Figure 7 : Mécanisme enzymatique de MraY.....	15
Figure 8 : Réaction catalysée par MurT/GatD.	19
Figure 9 : Structure du lipide II et site de liaison des inhibiteurs.	22
Figure 10 : Comparaison des structures de FemA et FmhB de <i>S. aureus</i> et de FemX de <i>W. viridescens</i>	24
Figure 11 : Duplex ARNt : substrat minimal de la réaction couplée AlaRS/FemX.....	28
Figure 12 : Mécanisme catalytique proposé pour FemX.....	29
Figure 13 : Synthèse de la chaîne latérale pentaglycine chez <i>S. aureus</i>	29
Figure 14 : Localisation de FemA à la membrane cytoplasmique de <i>S. aureus</i>	30
Figure 15 : Spécificité de substrat lipidiques de FmhB (ici annotée FemX), FemA et FemB de <i>S. aureus</i>	31
Figure 16 : Activité catalytique de FmhB avec des analogues de substrats lipidiques.	32
Figure 17 : Structure du PG et site de clivage de la lysostaphine.	34
Figure 18 : Inhibiteur de MurM mimant son état de transition tétraédrique	35
Figure 19 : Molécule inhibitrice analogue d'Ala-ARNt ^{Ala}	35
Figure 20 : Structure de la molécule bi-substrat inhibitrice de FemX de <i>W. viridescens</i>	36
Figure 21 : Structure des molécule bi-substrats inhibitrices de FmhB de <i>S. aureus</i>	37
Figure 22 : Participation des ARNt aminoacylés dans diverses voies métaboliques chez les bactéries.	38
Figure 23 : Structure des ARNt.	39
Figure 24 : Synthèse d'un ARNt chez les procaryotes.	40
Figure 25 : Atlas des modifications post-transcriptionnelles des ARNt de <i>S. aureus</i>	41
Figure 26 : Réaction de transacylation et site d'acylation des aaRS de classe I ou II.	43
Figure 27 : Rôle des ARNt dans la synthèse protéique.....	44
Figure 28 : Eléments d'identité permettant l'interaction avec la GlyRS et EF-Tu.	45
Figure 29 : Partition des Gly-ARNt ^{Gly} entre la synthèse protéique et la synthèse de la paroi chez <i>S. aureus</i>	60
Figure 30 : Hémi-synthèse d'analogues de lipides solubles.	78
Figure 31 : Turn over des transférases FmhB, FemA et FemB.	81
Figure 32 : Test enzymatique couplé avec FmhB, FemA et FemB.....	83
Figure 33 : Test enzymatique couplé avec FmhB, FemA et FemB avec un substrat amidé.	85
Figure 34 : « Fold change » calculés présentant l'impact de l'amidation des substrats sur les enzymes lors du test couplé.	86
Figure 35 : Impact de l'amidation sur la réaction catalysée par FmhB.	87
Figure 36 : Impact de l'amidation sur les deux réactions catalysées par FemA.	88
Figure 37 : Impact de l'amidation sur les deux réactions catalysées par FemB.....	89
Figure 38 : Pas de coopérativité entre FemB et FemA.....	91
Figure 39 : Test d'inhibition de FmhB.....	92
Figure 40 : Inhibition de FmhB par le lipide-II-C10-(Gly) ₅ à D-iGlu ² ou D-iGln ²	93

Figure 41 : Structure des inhibiteurs à glycol ou malonate, analogues de lipides à C ₁₀	93
Figure 42 : Inhibition des transférases de la famille Fem de <i>S. aureus</i> par les inhibiteurs de la série à glycol.....	96
Figure 43 : Inhibition de FmhB par les inhibiteurs possédant un groupement malonate.	98
Figure 44 : Inhibition de FmhB par le lipide-II-C ₁₀ -glycol à D-iGln ²	98
Figure 45 : Comparaison du modèle prédit par Alphafold2 et de la structure obtenue en cristallographie pour FemA.	102
Figure 46 : Paramètres estimant la fiabilité des modèles prédits par Alphafold2 pour FemB.	103
Figure 47 : Comparaison de structures de FmhB, FemA et FemB de <i>S. aureus</i>	104
Figure 48 : Comparaison de la géométrie du site catalytique des transférases Fem.	106
Figure 49 : Structure de FmhB C ^{70S} L ^{206T} en complexe avec un analogue de lipide II soluble.	108
Figure 50 : Carte des interactions possibles entre la protéine et le ligand (analogue de lipide).	109
Figure 51 : Positionnement des sucres, du PPI et du diprényl.	110
Figure 52 : Réseau possible d'interactions entre D-Ala ⁴ - D-Ala ⁵ du substrat et la protéine.	111
Figure 53 : Réseau possible d'interactions entre la L-Ala ¹ , le D-iGlu ² et la L-Lys ³ du substrat avec la protéine.....	112
Figure 54 : Mécanisme enzymatique proposée pour FmhB.	112
Figure 55 : Orientation de la chaîne latérale du résidu 3 du pentapeptide du ligand.	113
Figure 56 : Synthèse des bi-substrats.....	115
Figure 57 : Test d'inhibition de FmhB par les bi-substrats.....	116
Figure 58 : Structure de FmhB C ^{70S} L ^{206T} en complexe avec le BS 1.	118
Figure 59 : Comparaison des structures de FmhB C ^{70S} L ^{206T} obtenues en complexe avec un lipide..	119
Figure 60 : Carte des interactions possibles entre FmhB C ^{70S} L ^{206T} et le BS 1.	120
Figure 61 : Interaction du MurNAc et du PPI du BS 1 avec les résidus de la protéine.....	120
Figure 62 : Changement de positionnement du MurNAc.	121
Figure 63 : Impact du GlcNAc sur l'affinité de FmhB pour son substrat lipidique.	122
Figure 64 : Environnement de la L-Ala ¹ et du D-iGlu ²	123
Figure 65 : Rotation de la chaîne latérale du résidu 3 du substrat en présence d'ARN.....	124
Figure 66 : Positionnement du D-Ala ⁴ -D-Ala ⁵ de la molécule BS 1.....	124
Figure 67 : Positionnement du triazole du BS dans le site catalytique des enzymes.....	125
Figure 68 : Positionnement de l'adénosine terminale du BS.	126
Figure 69 : XNA étudiés comme substrats et inhibiteurs de FemX de <i>W. viridescens</i>	128
Figure 70 : Inhibition de FmhB par un BS composé de HNA.	141
Figure 71 : Impact de l'introduction de 2'F-ARN dans un BS à base de HNA.	142
Figure 72 : Modifications post transcriptionnelles trouvées chez les ARNt ^{Gly} de staphylocoques.	144
Figure 73 : Repositionnement du D-iGlu ² en présence de BS mimant la présence d'un ARNt aminoacylé.	146
Figure 74 : Modèle proposé pour la synthèse et la maturation du lipide II chez <i>S. aureus</i>	148

Liste des tableaux

Tableau 1 : Variabilité des chaînes latérales formant les ponts interpeptidiques chez certaines espèces de bactéries à Gram positif.....	17
Tableau 2 : Turn over des enzymes pour les substrats lipidiques à diprenyl.....	82
Tableau 3 : Constantes d'inhibition (K_i) obtenues pour les différentes molécules de la série d'inhibiteurs à glycol.	97

INTRODUCTION

1. Les antibiotiques

La découverte des antibiotiques dans les années 1920 a révolutionné le monde de la médecine permettant notamment de réduire la mortalité, d'augmenter l'espérance de vie et de développer de nombreuses techniques médicales (chirurgie invasive, lutte contre le cancer, etc...). Durant les années 1940 à 1960, de nouvelles molécules avec des spectres d'action variés ont été découvertes et introduites en cliniques, donnant lieu à la période de l'âge d'or des antibiotiques où quasiment toutes les infections bactériennes étaient traitables (Boyd et al., 2021). Malheureusement, le déclin progressif de la découverte de nouveaux antibiotiques et l'apparition et la diffusion de résistances chez de nombreuses souches bactériennes ont conduit à la crise d'antibiorésistance que nous connaissons aujourd'hui.

1.1. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques bloquent des processus biologiques essentiels à la viabilité, au développement ou à la croissance des bactéries et peuvent être classifiés selon leur mode d'action. Ils ont pour cibles : (i) la paroi bactérienne, (ii) la membrane cellulaire, (iii) la machinerie de synthèse des protéines, (iv) la synthèse de l'ADN/ARN et enfin (v) le métabolisme de l'acide folique (vitamine B9) (**Figure 1, partie rouge**). Les différences, tant structurelles que métaboliques, entre cellules eucaryotes et procaryotes permettent aux antibiotiques de cibler sélectivement les cellules bactériennes, rendant ces médicaments relativement non toxiques pour l'Homme (Cardoso et al., 2021). Les antibiotiques les plus utilisés et prescrits en thérapeutique humaine sont les β -lactamines (dont font par exemple partie la pénicilline et la méthicilline) qui bloquent l'étape finale de synthèse du peptidoglycane (PG), composant essentiel de la paroi bactérienne.

1.2. Résistances des bactéries aux antibiotiques

L'utilisation massive, abusive et parfois non contrôlée des antibiotiques ces dernières décennies, a provoqué l'émergence, la sélection et la diffusion de souches bactériennes multi-résistantes appelées « superbugs » qui sont devenues une des principales causes de mortalité dans le monde. La résistance aux antibiotiques peut être intrinsèque (naturelle) aux bactéries ou elle peut s'acquérir via des mutations chromosomiques ou des transferts de gènes horizontaux. Elle est médiée par quatre principaux mécanismes (i) l'efflux des antibiotiques vers le milieu extracellulaire, (ii) la modification de la cible rendant l'antibiotique inefficace, (iii) l'inactivation et/ou la dégradation enzymatique de l'antibiotique et enfin (iv) la réduction de la perméabilité de la paroi rendant la pénétration du médicament difficile (**Figure 1, partie bleu**) (Cardoso et al., 2021).

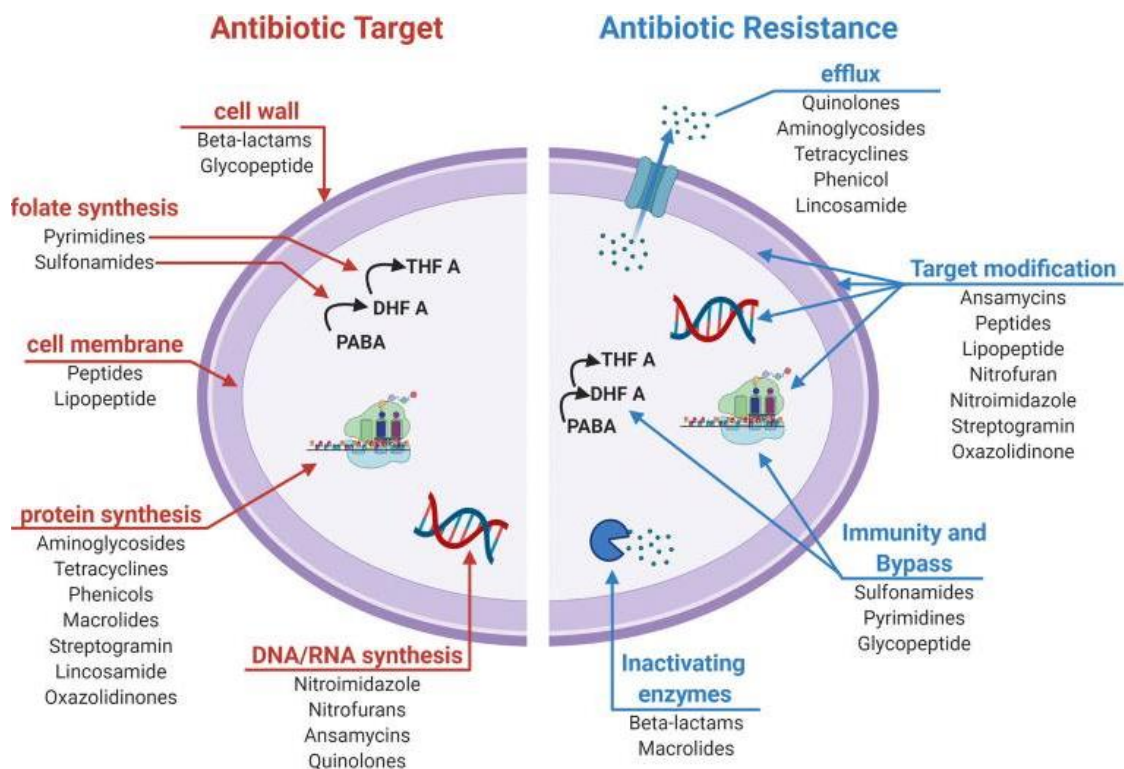


Figure 1 : Mécanismes d’actions et de résistances aux antibiotiques.

Les mécanismes d’actions des antibiotiques sont représentés en rouge et les mécanismes de résistances des bactéries aux antibiotiques en bleu. (Cardoso et al., 2021)

D’après les estimations du gouvernement britannique, d’ici 2050 la résistance aux antibiotiques pourrait être à l’origine de 10 millions de morts tous les ans (O’Neill, 2014). Ainsi, l’Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ainsi que le Centre pour la prévention et le Contrôle des maladies (CDC) ont déclaré la résistance aux antibiotiques comme étant l’une des plus graves menaces pesant sur la santé publique. En 2017, l’OMS a publié une liste d’agents pathogènes pour lesquels le développement de nouveaux antibiotiques est prioritaire. Parmi eux sont retrouvés les pathogènes ESKAPE : *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et les espèces du genre *Enterobacter* (WHO, 2017). L’agent pathogène *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculose, fait également l’objet d’un programme de lutte lui étant spécifique (WHO, 2021). La résistance bactérienne aux antibiotiques est particulièrement préoccupante car elle concerne désormais toutes les classes d’antibiotiques et se manifeste chez pratiquement toutes les bactéries pathogènes.

Dans ce contexte, le laboratoire dans lequel j’ai effectué ma thèse a pour objectifs principaux (i) l’étude et la compréhension des mécanismes de résistance aux antibiotiques, et (ii) l’identification

de nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement de nouvelles molécules antibactériennes afin d'améliorer la prise en charge et le traitement de patients. L'équipe s'intéresse tout particulièrement aux enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne.

2. Le peptidoglycane

2.1. La paroi bactérienne

Le peptidoglycane (PG) est un composant majeur de la paroi des bactéries. Ses principales fonctions sont de préserver l'intégrité cellulaire et de maintenir une forme cellulaire définie. Il joue également un rôle crucial dans la croissance et la division cellulaire. L'inhibition de sa synthèse ou sa dégradation entraîne la lyse bactérienne. Le PG peut également servir de point d'ancrage à d'autres composants de l'enveloppe bactérienne telles que des protéines de surface ou des acides teichoïques. (Vollmer et al., 2008)

Les bactéries à Gram négatif, dont fait partie l'organisme modèle *Escherichia coli*, possèdent une paroi composée d'une fine monocouche de PG d'environ 5nm, située dans l'espace périplasmique, entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe. La membrane externe est une bicouche lipidique dont le feuillet interne est composé de phospholipides et le feuillet externe de lipopolysaccharides (LPS) (**Figure 2A**).

La paroi des bactéries à Gram positif est caractérisée par une absence de membrane externe et est constituée de plusieurs couches de PG pouvant aller jusqu'à une épaisseur de 40 à 80 nm. Chez la majorité des bactéries à Gram positif, des polymères anioniques, appelés acides téichoïques, sont enchâssés dans les différentes couches de PG et sont liés aux résidus d'acide *N*-acétylmuramique (MurNAc). Les acides lipotéichoïques sont, quant à eux, insérés dans la membrane cytoplasmique via une ancre lipidique, traversent le PG et sortent à la surface des bactéries (Malanovic and Lohner, 2016) (**Figure 2B**). La paroi sert également d'ancrage à des protéines de surface qui peuvent être impliquées dans la pathogénicité de certaines bactéries telles que *Listeria monocytogenes* (via l'internaline B), *Streptococcus pneumoniae* (via PspA) ou *Staphylococcus aureus* (via la protéine A) (Navarre and Schneewind, 1999).

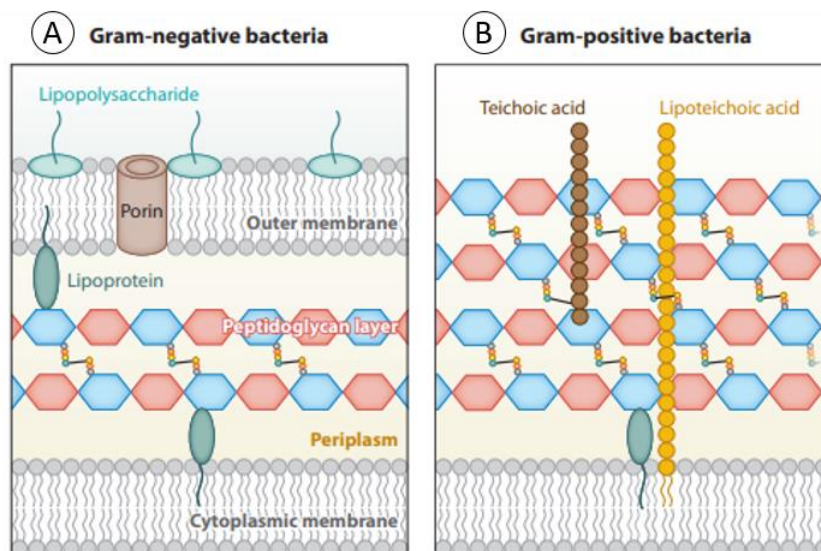


Figure 2 : Schéma des différents types de parois bactériennes.

(A) Paroi des bactéries à Gram négatif. (B) Paroi des bactéries à Gram positif. (Adapté de Radkov et al. 2018)

2.2. Structure et variabilité du peptidoglycane

Le PG est un hétéropolymère constitué de chaînes glycanes connectées entre elles par de courts ponts peptidiques (**Figure 3A**). La structure et la composition du PG varie en fonction des espèces bactériennes et des souches considérées. L'une de ses caractéristiques est qu'il est composé d'acides aminés de configuration L et D. Ces derniers sont uniquement synthétisés chez les procaryotes et sont intégrés au PG. L'alternance d'acides aminés de configuration L et D joue un rôle structural important et contribue à rendre le PG plus résistant à sa dégradation par les enzymes du milieu extracellulaire (Horcajo et al., 2012).

Les chaînes glycanes sont composées d'une alternance de résidus *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) et de MurNAc reliés entre eux par des liaisons glycosidiques de type $\beta 1 \rightarrow 4$. La longueur des chaînes glycanes est variable et ne corrèle pas avec l'épaisseur du PG. Par exemple, chez les bactéries à Gram positif *Bacillus subtilis* et *S. aureus* les nombres de sous unités disaccharidiques sont respectivement de 50 à 250 et de 18 (Vollmer et al., 2008).

La sous-unité du PG est un disaccharide peptide composé du GlcNAc et du MurNAc dont le groupe D-lactoyle est lié à une tige peptidique dont la composition est généralement la suivante : L-Alanine¹-D-iso-Glutamate²-L-Lysine³-D-Alanine⁴-D-Alanine⁵. Il existe une certaine variabilité au niveau de la composition de cette tige pentapeptidique. Chez la majorité des bactéries à Gram positif (et chez les mycobactéries) le résidu D-iGlu est amidé sur son carbone alpha et devient ainsi une D-iso-

Glutamine (D-iGln). La lysine en position 3 trouvée chez *S. aureus* et *S. pneumoniae* est substituée par de l'acide diaminopimélique (DAP) chez *E. coli*, de la L-ornithine (L-Orn) chez les Spirochètes ou encore de la L-homosérine chez *Corynebacterium poinsettia*. Les espèces bactériennes produisant, ou devenues résistantes aux glycopeptides (certaines espèces du genre *Enterococcus*) possèdent quant-à-elles un résidu D-Lactate (D-Lac⁵) terminal à la place de la D-Alanine (**Figure 3B**). (Schleifer and Kandler, 1972). La structure des sucres des sous-unités du PG peut également être modifiée, notamment via une O-acétylation ou une N-glycolylation du MurNAc, ou bien une déacétylation d'un ou des deux sucres. Ces modifications des chaînes glycanes changent les propriétés de la paroi et peuvent ainsi contribuer à la pathogénicité ou à la reconnaissance des bactéries par le système immunitaire (Wolf and Underhill, 2018).

Dans le PG mature, les chaînes glycanes sont reliées entre elles soit de manière directe (par exemple chez *E. coli*), via la formation d'une liaison amide entre le groupe carboxyle du D-Ala⁴ et le groupe amine de l'acide aminé en position 3, soit par l'intermédiaire d'un court pont peptidique. Il existe une grande variabilité dans la composition de ces ponts interpeptidiques, par exemple chez *S. aureus* il est formé de cinq glycines, tandis que chez *Weissella viridescens* d'une L-Ala-L-Ser ou L-Ala-L-Ser-L-Ala (Vollmer et al., 2008).

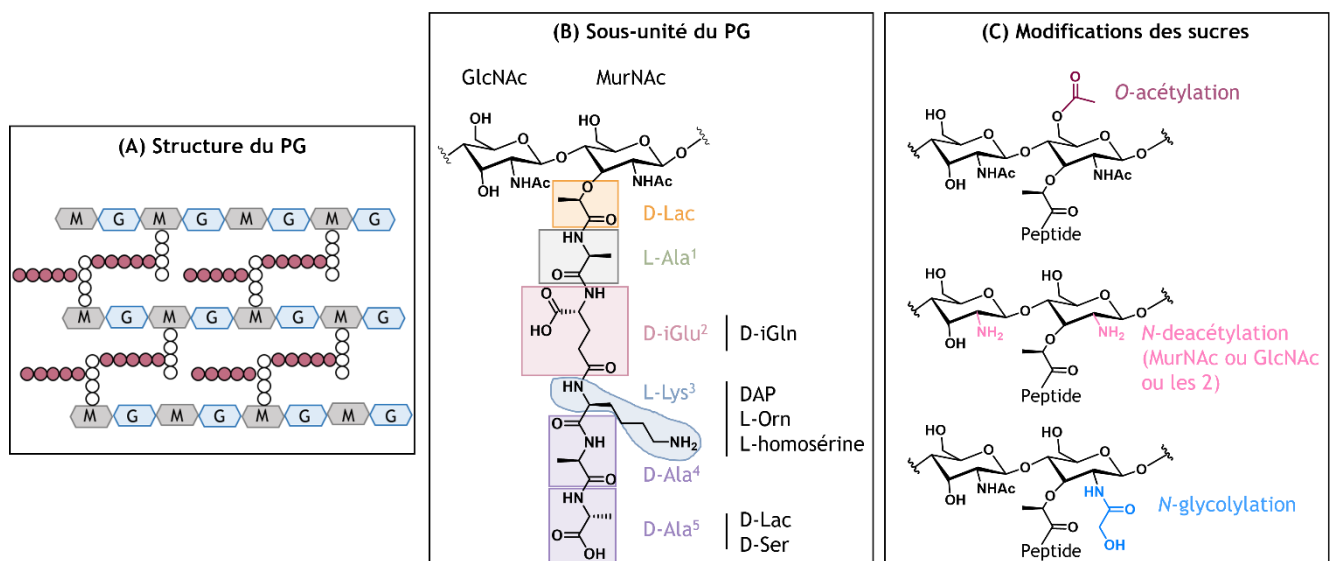


Figure 3 : Structure et variabilité du PG.

(A) Schéma de la structure générale du PG de *S. aureus* avec des ponts interpeptidiques pentaglycine. **(B)** Structure chimique du disaccharide peptide formant la sous-unité du PG. **(C)** Modifications possibles des sucres du disaccharide peptide.

2.3. Synthèse du peptidoglycane

La synthèse du PG est un processus complexe qui peut se décomposer en 3 étapes majeures : une phase cytoplasmique menant à la synthèse du précurseur UDP-MurNAc pentapeptide (UM5K ou nucléotide de Park), une phase membranaire aboutissant à la formation de GlcNAc-MurNAc-(pentapeptide)-pyrophosphoryl undecaprenol (lipide II) comprenant parfois une étape de maturation du lipide, et une phase d'export de ces précurseurs lipidiques et de polymérisation du PG (médiée par les protéines de liaisons à la pénicilline (PLP)). (Figure 4).

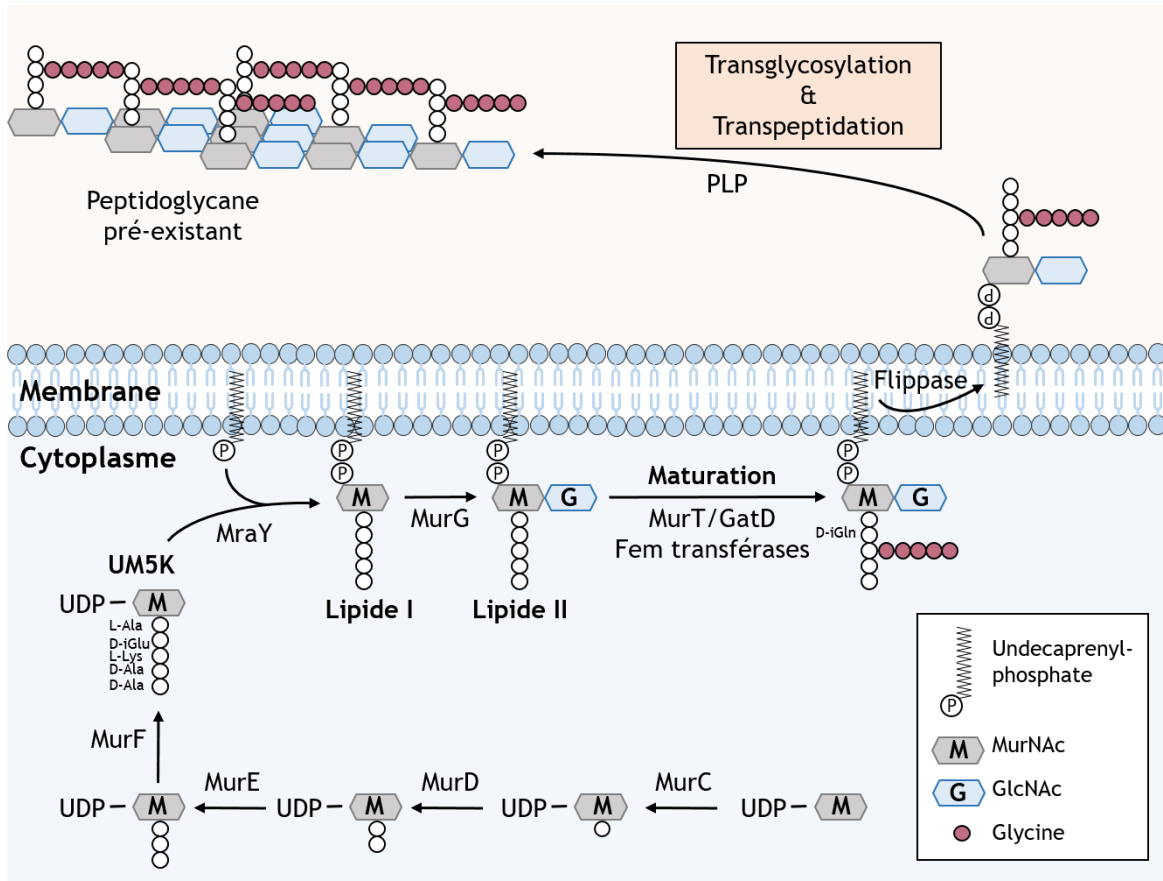


Figure 4 : Exemple de synthèse du PG chez *S. aureus*, bactérie à Gram positif.

Chez *S. aureus* les ponts interpeptidiques sont constitués de 5 glycines et les résidus en position 2 de la tige pentapeptidique sont très majoritairement amidés. Adaptée de (Pinho et al., 2013)

2.3.1. Phase cytoplasmique

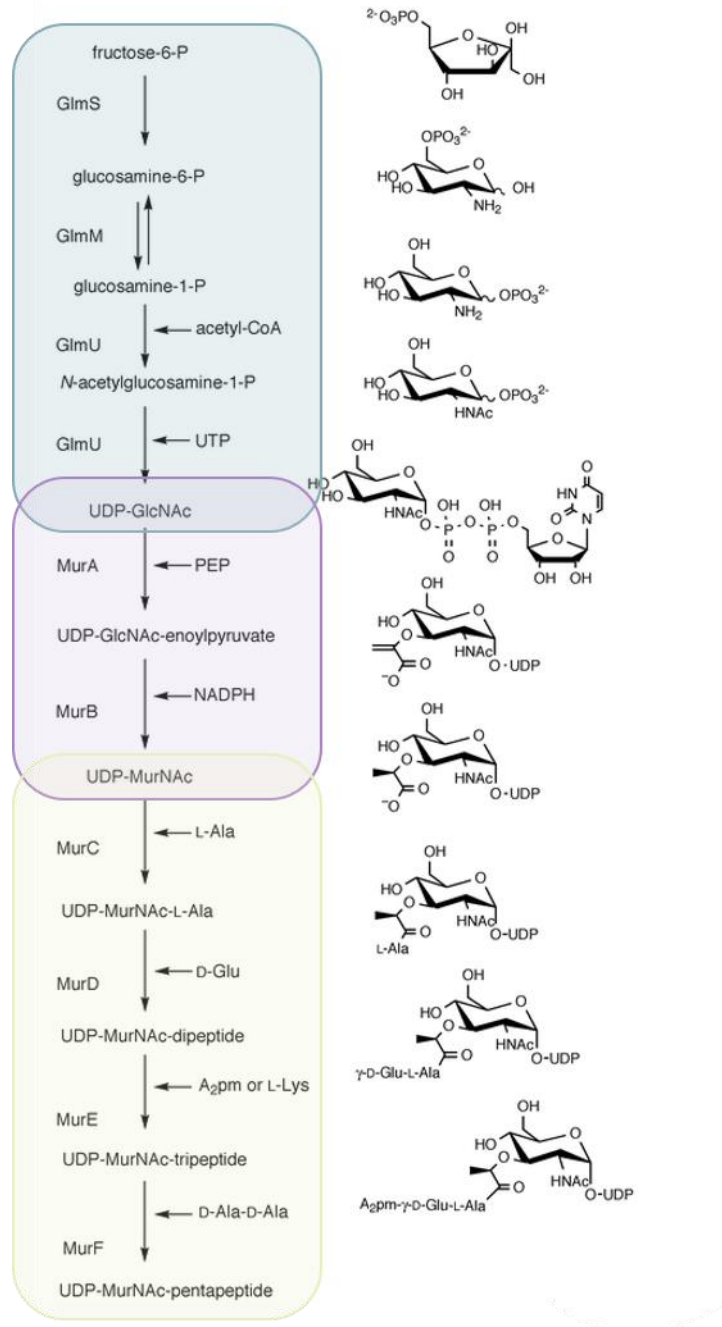


Figure 5 : Etapes cytoplasmiques de la synthèse du PG menant à la formation de l'UM5K.

L'encadré vert, le violet et le jaune comprennent respectivement les étapes menant à la formation de l'UDP-GlcNAc, l'UDP-MurNAc et l'UDP-MurNAc-pentapeptide. (Adapté de Heijenoort 2001).

Synthèse de l'UDP-*N*-Acétylglucosamine (UDP-GlcNAc)

L'UDP-*N*-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) est synthétisé à partir du fructose-6-phosphate en quatre étapes et requiert l'action de 3 enzymes successives. L'enzyme glucosamine-6-phosphate synthase (GlmS) permet la formation de glucosamine-6-phosphate à partir du fructose-6-phosphate, la phosphoglucosamine mutase (GlmM) catalyse de façon réversible la formation de la glucosamine-6-phosphate en glucosamine-1-phosphate, et enfin l'enzyme bi-fonctionnelle *N*-acétyl glucosamine-1-phosphate uridyl-transferase (GlmU) permet l'acétylation puis l'uridylation de la *N*-acétylglucosamine afin de générer l'UDP-GlcNAc. (**Figure 5, encadré vert**) (Barreteau et al., 2008).

Synthèse de l'UDP-*N*-acétylmuramique (UDP-MurNAc)

La synthèse de l'UDP-MurNAc à partir de l'UDP-GlcNAc nécessite deux étapes successives catalysées par les enzymes suivantes : l'UDP-*N*-acétylglucosamine énoypyruvyl transférase (MurA) et l'UDP-*N*-acétylénoypyruvoylglucosamine (MurB). MurA transfère un groupement énoypyruvate d'un phosphoénoypyruvate (PEP) en position 3'-hydroxyl de l'UDP-GlcNAc entraînant le relargage de phosphate inorganique. Le produit de réaction, l'UDP-GlcNAc-énoypyruvate, est ensuite pris en charge par MurB qui réduit le groupement énoypyruvate en D-lactate (**Figure 5, encadré violet**) (Barreteau et al., 2008).

Synthèse de l'UDP-MurNAc pentapeptide

La synthèse de l'UDP-MurNAc pentapeptide (UM5K) fait intervenir les enzymes de la superfamille des Mur ligases : MurC, MurD, MurE et MurF (**Figure 5, encadré jaune**). Ces enzymes catalysent la synthèse non ribosomale de la tige peptidique du PG. Leur essentialité à la survie bactérienne et leur absence chez les eucaryotes en font des cibles intéressantes pour le développement de molécules antibactériennes (Kouidmi et al., 2014).

Les Mur ligases ont trois substrats : l'adénosine triphosphate (ATP), le précurseur nucléotidique UDP-MurNAc préalablement lié ou non à un acide aminé ou un peptide, et un acide aminé ou un dipeptide. Ces enzymes présentent des régions conservées, et la comparaison de leurs séquences chez différents organismes a permis l'identification de sept résidus conservés et une séquence consensus (GXXGKT/S) de liaison à l'ATP (Bouhss et al., 1997). Elles partagent également des caractéristiques structurales et un mécanisme enzymatique connu.

Les Mur ligases fonctionnent selon un mécanisme enzymatique ordonné : l'ATP est fixée en premier, suivi du substrat nucléotidique puis de l'acide aminé ou du peptide. La première étape est l'activation du groupement carboxyle du substrat nucléotidique par l'ATP, menant à la formation d'un intermédiaire acyle-phosphate. Le groupement amine de l'acide aminé effectue alors une attaque

nucléophile sur l'acyle-phosphate ou le groupement phosphate joue le rôle de groupement partant via la formation d'un intermédiaire tétraédrique. Cette réaction entraîne la formation de la liaison peptidique et la libération d'une molécule de phosphate inorganique (Pi). Il a été suggéré que l'acide aminé entre dans la réaction sous sa forme déprotonnée pour pouvoir réaliser l'attaque nucléophile (Figure 6).

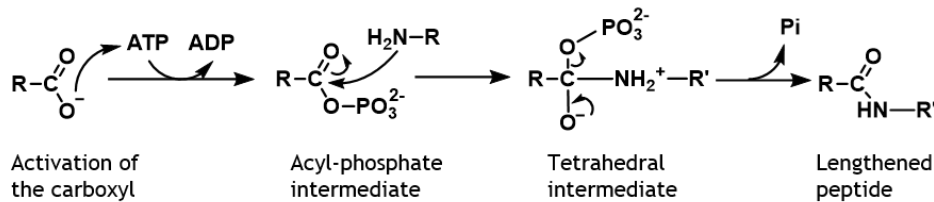


Figure 6 : Mécanisme catalytique des enzymes de la superfamille des Mur ligases.

Adaptée de (Kouidmi et al., 2014).

Classiquement, MurC (UDP-MurNAc : L-alanine ligase), MurD (UDP-MurNAc-L-Alanine : D-glutamate ligase), MurE (UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu : méso-diaminopimélate ligase) et MurF (UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-DAP : D-alanyl-D-alanine ligase) ajoutent successivement de la L-Ala, du D-iGlu, du méso-DAP (chez les bactéries à Gram négatif et les mycobactéries) ou de la L-lys (chez les bactéries à Gram positif) et un di-peptide D-Ala-D-Ala, amenant à la formation de l'UM5K, précurseur nucléotidique du PG.

La perméabilité des Mur ligases a été étudiée et il a été montré que MurC de *S. aureus* et de *E. coli* acceptent comme substrat de la L-Ala, de la L-Ser et de la glycine avec une forte préférence pour la L-Ala (Patin et al., 2010). Chez les bactéries du genre *Corynebacterium* la spécificité de MurC est différente et de la glycine est retrouvée en position 1 de la tige pentapeptidique. MurD est, quant-à-elle, hautement spécifique pour le glutamate de configuration D et ce résidu est retrouvé majoritairement en position 2 dans le PG (Heijenoort, 2001). Il a également été démontré que la spécificité de substrat de MurE varie selon l'espèce bactérienne étudiée : elle ajoute du DAP chez la plupart des bactéries à Gram négatif, les mycobactéries et les bacilles, de la L-Lys chez la plupart des bactéries à Gram positifs, et de la L-Orn chez les spirochètes. Le rôle de MurE est crucial pour maintenir l'intégrité du PG car l'incorporation d'un acide aminé incorrect en position 3 de la tige pentapeptidique peut mener à des changements morphologiques et à la lyse bactérienne (Mengin-Lecreux et al., 1999). MurE de *E. coli* et *S. aureus* sont des enzymes orthologues ayant des spécificités de substrat respectives et bien distinctes pour le DAP ou la L-Lys. Une séquence consensus tétra-peptidique DNPR ou D(D,N)P(N,A) a été identifiée comme étant responsable de l'incorporation du DAP ou de la L-Lys (Boniface et al., 2006). Une étude structurale plus récente a montré que d'autres régions de MurE de

S. aureus contiennent des résidus sélectifs importants pour la formation de la poche fixant la L-Lys (Ruane et al., 2013). L'enzyme MurF catalyse l'ajout d'un dipeptide D-Ala-X ou X peut être de la D-Ala, du D-lactate ou de la D-Ser (même s'il existe quelques rares exemples où de L,L-DAP, de D-Lys ou de L-homosérine sont retrouvés en position 5 du pentapeptide). Une étude a montré que l'expression hétérologue de MurF de *S. aureus* dans une souche mutante d'*E. coli* n'exprimant plus cette enzyme, permet de maintenir la synthèse de l'UM5K, indiquant que MurF est permissive et catalyse sa réaction avec de l'UDP-MurNAc tripeptide qu'il comporte du DAP ou de la L-Lys (Patin et al., 2010).

2.3.2. Phases membranaires : synthèse des intermédiaires lipidiques

Une fois synthétisé l'UDP-MurNAc-pentapeptide est pris en charge par l'enzyme MraY (phospho-*N*-acétyl-muramoyl-pentapeptide transférase) qui catalyse son transfert sur un accepteur undecaprényl phosphate (C₅₅-P) ancré à la membrane cytoplasmique afin de former le MurNAc-(pentapeptide)-pyrophosphoryl undecaprenol (lipide I). L'enzyme MurG (*N*-acétyl-glucosamine transférase) converti ensuite le lipide I en GlcNAc-MurNAc-(pentapeptide)-pyrophosphoryl undecaprenol (lipide II) en catalysant l'addition de la *N*-acétylglucosamine (Heijenoort, 2001).

Synthèse du lipide I

MraY, découverte dans les années 1970 chez *S. aureus*, est une protéine membranaire. L'alignement de 25 séquences de MraY de différents organismes bactériens a permis d'identifier cinq séquences hydrophiles conservées contenant 24 acides aminés invariants et d'établir un modèle topologique commun pour les enzymes de *E. coli* et de *S. aureus*, modèle suggéré comme pouvant être valide pour MraY de tous les procaryotes (Bouhss et al., 1999). La réaction catalysée par MraY, souvent appelée réaction de transfert, fonctionne selon un mécanisme enzymatique comportant deux étapes : (1) une attaque nucléophile par un résidu non identifié de MraY sur le phosphate β de l'UDP-MurNAc-pentapeptide qui génère un intermédiaire covalent enzyme-phospho-MurNAc-pentapeptide et le relargage d'UMP et (2) une attaque par un oxyanion du C₅₅-P sur le phosphate de l'intermédiaire pour former le lipide I et régénérer l'enzyme sous sa forme native (**Figure 7**).

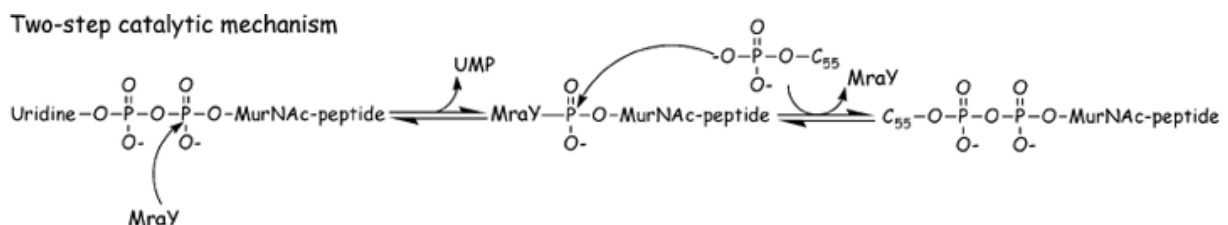


Figure 7 : Mécanisme enzymatique de MraY.

Issue de (Bouhss et al., 2008).

Plusieurs études ont démontré *in vivo* et *in vitro* que *MraY* est peu spécifique et tolère une grande variété de substrat, notamment au niveau de la chaîne pentapeptidique de l'UDP-MurNAC-pentapeptide (dipeptides, tripeptides, tetrapeptides, pentapeptides, à DAP ou L-Lys). En ce qui concerne l'accepteur lipidique, des essais *in vitro* ont démontré que *MraY* de *E. coli* accepte des substrats heptaprenyl (C₃₅) et dodecaprenyl (C₆₀) phosphate, tandis que celle de *Micrococcus flavus* est active avec des substrats comportant de 2 à 25 motifs isoprenyl avec une efficacité maximale observée pour les substrats de plus de 35 carbones (Bouhss et al., 2008). Une étude publiée en 2014 a permis de montrer que *MraY* de *B. subtilis* accepte une variété d'accepteurs lipidiques, allant du C₁₀ au C₅₅ avec des conformations variables (Huang et al., 2014).

Synthèse du lipide II

MurG est une glycosyl transférase essentielle à la survie bactérienne découverte dans les années 80 chez *E. coli*. Elle catalyse le transfert du GlcNAc de l'UDP-GlcNAc sur le groupement hydroxyle en position 4 du MurNAC du lipide I pour former un disaccharide relié par une liaison $\beta 1 \rightarrow 4$. Elle fonctionne selon un mécanisme bi-bi ordonné dans lequel l'UDP-GlcNAc se fixe en premier (Bouhss et al., 2008). L'utilisation d'analogues synthétiques de lipide II radiomarqués a permis de rapporter que la réaction catalysée par *MurG* est réversible (Auger et al., 2003).

Modification/maturation du lipide II chez les bactéries à Gram positif

Après sa synthèse, le lipide II peut subir une ou plusieurs étapes de maturation avant d'être exporté à la surface de la bactérie.

Synthèse de la chaîne latérale

Chez les bactéries à Gram positif, l'addition de la chaîne latérale formant les ponts peptidiques a généralement lieu après la synthèse du lipide II. La longueur de ces ponts varie de 2 à 7 acides aminés et ils sont généralement composés de petits acides aminés tels que la glycine, l'alanine ou la sérine (**Tableau 1**). Les enzymes synthétisant les chaînes latérales sont classées en deux groupes : les transférases de la famille Fem catalysant le transfert d'un acide aminé de configuration L ou d'une glycine portée par un ARN de transfert (ARNt aminoacylé : aa-ARNt^{aa}) sur le lipide II ou des enzymes ATP-dépendantes qui n'utilisent pas les ARNt (Münch and Sahl, 2015). Néanmoins parfois cette modification a lieu au niveau du précurseur nucléotidique, comme chez *W. viridescens* ou chez *Enterococcus faecalis* (Bouhss et al., 2002; Maillard et al., 2005).

Chaînes latérales formant les ponts interpeptidiques	Espèce bactérienne	Enzymes	Substrats
(Gly) ₅	<i>S. aureus</i>	FmhB, FemA, FemB (Fem transférases)	Lipide II/ARNt
L-Ala-L-Ala	<i>E. faecalis</i>	BppA1 et BppA2 (Fem transférases)	UM5K/ARNt
L-Ala-L-Ser ou L-Ala-L-Ser-L-Ala	<i>W. viridescens</i>	FemX* (Fem transferase)	UM5K/ARNt
L-Ser-L-Ala ou L-Ala-L-Ala	<i>S. pneumoniae</i>	MurM, MurN (Fem transferases)	Lipide II/ARNt
D-Asx	<i>Enterococcus faecium</i>	Asl _{fm} (Enzyme ATP dépendante)	UM5K/ATP

Tableau 1 : Variabilité des chaînes latérales formant les ponts interpeptidiques chez certaines espèces de bactéries à Gram positif.

* FemX ajoute la 1^{ère} L-Ala, les résidus en 2^{ème} et 3^{ème} positions sont ajoutés par une Fem transférase encore inconnue à ce jour. (Vollmer, Blanot, et De Pedro 2008)

Amidation

Chez un certain nombre d'espèces bactériennes pathogènes à Gram positif telles que *S. aureus* ou *Streptococcus pneumoniae*, le résidu D-*i*Glu² de la tige peptidique est amidé sur son groupe α carboxylate permettant la formation de D-*i*Gln². Le PG de *S. aureus* est caractérisé par un haut degré de réticulation (93% des chaînes latérales sont engagées dans un pont interpeptidique) et une amidation quasiment complète de tous les résidus D-*i*Glu (Leisico et al., 2018; Vollmer et al., 2008).

Les enzymes formant le complexe MurT/GatD qui catalyse cette réaction d'amidation ont été identifiées en 2012, dans le contexte d'un crible afin d'identifier des gènes conférant la résistance à la méthicilline de la souche COL de *S. aureus*. Le mutant conditionnel pour l'expression de MurT/GatD, ainsi que le mutant *femC* déficient pour la voie de synthèse de la glutamine présentent un phénotype similaire caractérisé par des réductions des taux d'amidation du résidu D-*i*Glu et de réticulation du PG mature, une réduction de la résistance aux β-lactamines, une réduction de la vitesse de croissance ainsi qu'une sensibilité augmentée à la dégradation du PG par le lysozyme (Figueiredo et al., 2012; Gustafson et al., 1994; Münch et al., 2012). Ces études semblent indiquer que l'amidation joue un rôle crucial pour les réactions de transpeptidation catalysées par les PLP et dans la résistance à la méthicilline.

A contrario, la réduction du taux d'amidation du PG mature dans la paroi de *S. aureus*, combinée à un épaissement de la paroi, serait impliquée dans la résistance à la vancomycine (le mécanisme d'action de cet antibiotique est décrit dans le paragraphe 2.5.1). Il a été montré que les mucopeptides non amidés posséderaient une meilleure affinité pour la vancomycine que les mucopeptides amidés, et permettraient donc de « piéger » les molécules de vancomycine dans la paroi déjà existante les empêchant ainsi d'atteindre leur cible (Cui et al., 2000; Hanaki et al., 1998).

L'impact de l'amidation du PG de *S. aureus* sur sa capacité à être reconnu par l'hôte et sur sa capacité pro-inflammatoire a également été étudié. En effet, les fragments issus de la dégradation de PG peuvent être détectés par les cellules hôtes notamment par le récepteur NOD2 pour les bactéries à Gram positif et déclencher une réponse immunitaire innée via la sécrétion de « tumor necrosis factor alpha » (TNF α). NOD2 reconnaît un motif appelé MDP formé du MurNAc-L-Ala¹-D-iGlu². Cette étude a montré que les PG issus de souche déficiente pour l'amidation (mutant *femC*) et de souche sauvage de *S. aureus* présentent une capacité pro-inflammatoire similaire. Ils en ont donc conclu que l'amidation du résidu D-iGlu² n'a pas d'impact sur la reconnaissance du PG par le récepteur NOD2 (Kraus et al., 2007).

Le mécanisme d'action du complexe MurT/GatD a été caractérisé et décrit grâce notamment à l'obtention de structures (**Figure 8**). La présence de MurT et GatD et la formation du complexe MurT/GatD est indispensable pour la réaction d'amidation, qui est ATP et Mg²⁺ dépendante et nécessite la présence de glutamine comme donneur d'azote. Très peu d'information sont disponibles sur l'étape (ni temporelle, ni spatiale) à laquelle agit le complexe MurT/GatD. Seul un test de spécificité de substrats a été effectué avec les protéines de *S. aureus* et a démontré que certains intermédiaires lipidiques (lipide I, lipide II et lipide II-(Gly)₅) pouvaient être amidés par le complexe contrairement à l'UM5K, suggérant que le processus d'amidation a lieu lors de la phase de synthèse des précurseurs lipidiques du PG. Il a également été proposé que la réduction de polarité du lipide II-(Gly)₅ par amidation des résidus D-iGlu² pourrait faciliter et/ou constituer un signal pour sa translocation à travers la membrane plasmique (Münch et al., 2012).

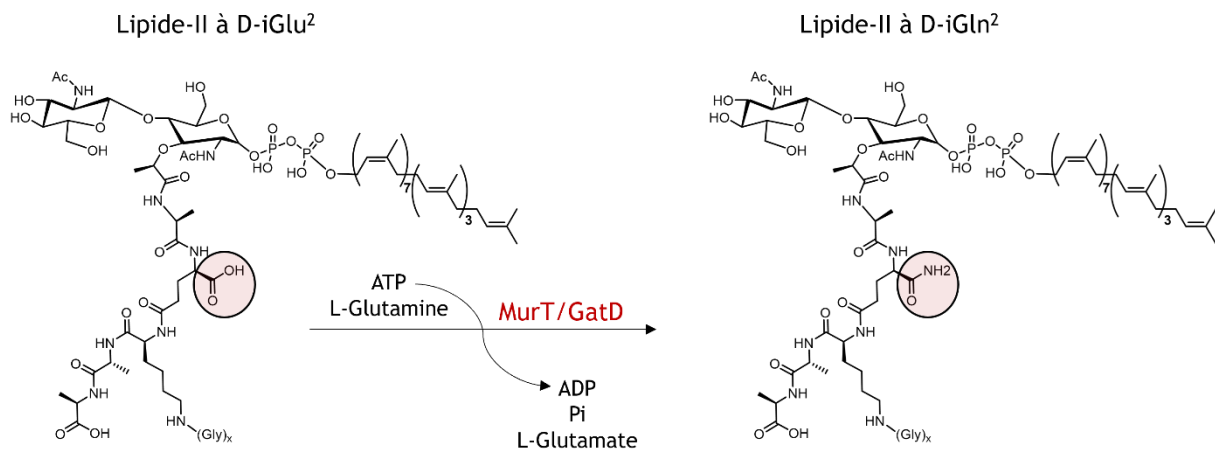


Figure 8 : Réaction catalysée par MurT/GatD.

Adaptée de (Nöldeke et al., 2018)

Les enzymes MurT et GatD sont également essentielles chez *Mycobacterium tuberculosis* et *S. pneumoniae*, et sont conservées au sein des bactéries à Gram positif pathogènes possédant un PG amidé. Ces particularités font de MurT/GatD des cibles intéressantes pour le développement de nouveaux antibiotiques (Morlot et al., 2018; Nöldeke and Stehle, 2019).

2.3.3. Transport du lipide à travers la membrane

Une fois le lipide modifié, il est transloqué à travers la membrane plasmique et exporté à la surface de la bactérie. L'identité de la ou des protéines permettant le transport du lipide à travers la membrane plasmique est encore soumise à controverse. Des tests *in vitro* et *in vivo* chez *E. coli* ont permis d'identifier deux protéines candidates : FtsW et MurJ (Egan et al., 2020).

FtsW est une protéine de la famille SEDS (Shape, Elongation, Division and Sporulation). Elle présente une activité *in vitro* et est capable de transporter du lipide II à travers une membrane de liposome, mais à ce jour, aucun essai *in vivo* n'a permis de démontrer son activité.

MurJ (ou MviN) est une protéine intégrale de membrane, faisant partie de la superfamille des transporteurs MOP (Multidrug, Oligosaccharide-lipid, Polysaccharide). Contrairement à FtsW, elle présente une activité *in vivo*, et son absence entraîne une accumulation de précurseur du PG dans le cytoplasme des bactéries. En revanche, des tests ont souligné son absence d'activité *in vitro*, bien qu'elle se lie au lipide II (Ruiz, 2015).

Plus récemment, une équipe a identifié chez *B. subtilis* une protéine alternative possédant une activité flippase. Cette protéine, nommée Amj, est essentielle en absence de MurJ et est capable de remplacer fonctionnellement MurJ chez *E. coli* et *B. subtilis* et de maintenir la viabilité cellulaire (Meeske et al., 2015).

2.3.4. Polymérisation du peptidoglycane

La dernière étape de synthèse du PG est assurée par les PLP qui catalysent les réactions de transpeptidation et transglycosylation, essentielles à l'intégration des précurseurs du PG nouvellement synthétisés au PG déjà existant à la surface de la bactérie.

Les PLP permettent (i) la polymérisation des chaînes glycanes via leur activité transglycosylase (ou TGase) et (ii) la réticulation et la formation des ponts interpeptidiques au sein du PG via leur activité transpeptidase (ou TPase). Elles sont classées en 2 groupes : les PLP de haute masse moléculaire (HMM pour high molecular mass) et celles de basse masse moléculaire (LMM pour low molecular mass) et possèdent toutes un domaine de liaison à la pénicilline. Les PLP HMM sont des enzymes bi-fonctionnelles ancrées à la membrane via un segment transmembranaire. Elle possède un domaine C-terminal ayant une activité transpeptidase et un domaine N-terminal possédant soit une activité glycosyltransférase (PLP de classe A) soit un rôle encore méconnu dans la morphogénèse cellulaire (PLP de classe B). Les PLP LMM possèdent quant-à-elles, des activités D-D-carboxypeptidase et/ou endopeptidase. Chez *E. coli*, les 7 PLP LMM sont impliquées dans les processus de division cellulaire, de maturation du PG et de son recyclage (Sauvage et al., 2008).

Le nombre de PLP est variable selon les espèces bactériennes. Par exemple, toutes les souches de *S. aureus* possèdent quatre PLP (PLP 1 à 4), une PLP de classe A (PLP2), deux PLP de classe B (PLP 1 et 3) et enfin une PLP LMM (PLP4). Cette bactérie ne possède pas de complexe d'élongation, sa seule PLP de classe A, la PLP2, est donc localisée au septum afin de maintenir une synthèse optimale du PG au niveau du site de division. La PLP4 possède une activité transpeptidase afin de maintenir un haut degré de réticulation dans le PG mature (Sauvage et al., 2008), et une étude plus récente tendrait à lui conférer un rôle dans la résistance aux céphalosporines dont le mécanisme reste à élucider (da Costa et al., 2018). Les souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM), possèdent une PLP surnuméraire, la PLP2a (encodée par le gène *mecA*) qui est une PLP de faible affinité pour les β -lactamines. En présence de ces antibiotiques, la PLP2a permet de maintenir la formation des ponts interpeptidiques, via son activité TPase. La PLP2, seule PLP bi-fonctionnelle, est également capable de continuer ses réactions de transglycosylation. Dans les souches SARM et en présence de β -lactamines, l'étape finale de synthèse du PG est donc réalisée de manière coopérative par l'activité TGase de PLP2 et l'activité TPase de la PLP2a acquise (Pinho et al., 2001).

2.4. Recyclage et turnover du peptidoglycane

Le PG est une structure dynamique évoluant au cours du cycle cellulaire de la bactérie. Afin de permettre l'intégration de nouvelle sous-unité, le PG est notamment soumis à des processus de dégradation menant à la formation de fragments de PG pouvant être recyclés par la bactérie (recyclage) ou relargués dans le milieu cellulaire (turnover).

Chez *E. coli*, bactérie modèle à Gram négatif, les voies métaboliques de recyclage et de turnover sont assez bien connues et caractérisées. De nombreuses enzymes sont impliquées dans la dégradation du PG. Les endopeptidases et les carboxypeptidases hydrolysent la tige peptidique, les transglycosylases lytiques clivent la liaison entre le MurNAc et le GlcNAc, et les amidases clivent la liaison entre le MurNAc et la L-Ala¹. Les fragments générés peuvent être pris en charge par des transporteurs de la membrane plasmique (Opp et AmpG), transloqués dans le cytoplasme et réintégrés à la voie de biosynthèse du PG. Ils peuvent également participer à d'autres processus cellulaires tel que la glycolyse. Environ 45% du PG est recyclé par génération, tandis que 6 à 8% du PG est relargué dans le milieu extracellulaire.

Chez les bactéries à Gram positif, le recyclage et le turnover n'ont pas fait l'objet d'études aussi poussées que pour *E. coli*. Des orthologues d'enzymes de *E. coli* ont été identifiés, et il semblerait que la dégradation du PG repose sur l'action de muramidases « lysosome-like », d'amidases, de carboxypeptidases et des transporteurs ABC *mpp/opp* like (Reith and Mayer, 2011).

2.5. Molécules inhibant la synthèse du peptidoglycane

2.5.1. Inhibiteurs de l'étape de polymérisation du PG

La synthèse du PG est la cible de deux classes d'antibiotiques majeures les β -lactamines et les glycopeptides (vancomycine et téicoplanine). Les β -lactamines sont des analogues structuraux, et stéréochimiques du motif D-Ala-D-Ala terminal du substrat des PLP, et inhibent de façon irréversible ces enzymes en agissant comme des substrats suicides (Lima et al., 2020). Les glycopeptides ciblent quant-à-eux les lipides II présents à la face externe de la membrane plasmique. Ils sont actifs uniquement sur les bactéries à Gram positif (ne pouvant pas pénétrer le périplasme des bactéries à Gram négatif), et ils interagissent avec l'extrémité D-Ala⁴-D-Ala⁵ du lipide II, et provoquent ainsi une gêne stérique bloquant l'étape finale de synthèse du PG catalysée par les PLP (Courvalin, 2006).

2.5.2. Molécules ciblant les lipides

Les lipides I et II sont des cibles intéressantes pour le développement de nouvelles molécules anti-bactériennes. Il s'agit de précurseurs essentiels à la synthèse du PG, et la synthèse de lipide II est limitée par la quantité d'undecaprényl phosphate disponible dans la cellule (environ 2×10^5 par cellule). D'autres molécules telles que les lantibiotiques, la ramoplanine ou encore les défensines ne sont pas considérées comme des antibiotiques mais ont des propriétés antibactériennes. Elles se fixent aux intermédiaires lipidiques, engendrant leur séquestration et bloquant donc la synthèse du PG (Ng and Chan, 2016). La colicine M, une autre molécule possédant une activité bactéricide, hydrolyse le lipide II et génère la formation de deux produits : le C₅₅-OH et le 1-PP-MurNac-pentapeptide-GlcNAc (Chérier et al., 2021) (**Figure 9**).

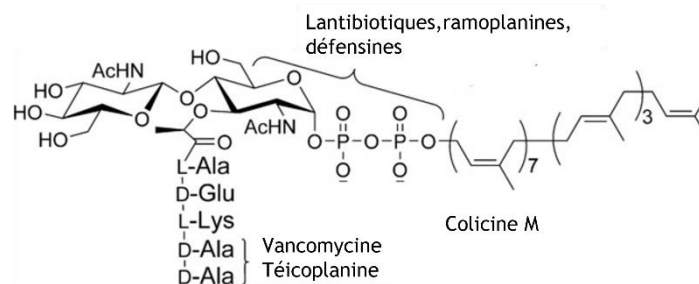


Figure 9 : Structure du lipide II et site de liaison des inhibiteurs.

Adapté de (Ng and Chan, 2016)

2.5.3. La fosfomycine

Les Mur synthétases constituent également des cibles de choix pour le développement de molécules antibactériennes qui agiraient au niveau de la phase cytoplasmique de la synthèse du PG. A ce jour, la fosfomycine est le seul antibiotique disponible et utilisé en clinique qui agit sur cette étape. Cette molécule est un analogue du PEP et se lie de façon covalente et irréversible à MurA entraînant ainsi un arrêt de la synthèse du PG (El Zoeiby et al., 2003).

3. Les aminoacyl transférases de la famille Fem

Comme écrit précédemment, dans le paragraphe **2.3.2**, les aminoacyl transférases de la famille Fem sont des enzymes ARNt-aminoacylés dépendantes, catalysant la synthèse de la chaîne latérale, formant les ponts interpeptidiques dans le PG mature. La longueur de ces ponts varie de 2 à 7 acides aminés et ils sont généralement composés de petits acides aminés tels que la glycine, l'alanine ou la sérine. Dans ce chapitre, je détaillerai la diversité des transférases de la famille Fem et je me concentrerai plus particulièrement sur les enzymes de *S. aureus* qui ont constitué le principal sujet d'étude de ma thèse et sur FemX de *W. viridescens* qui a constitué un modèle d'étude dans une partie de mon projet. Je décrirai l'état de l'art sur la reconnaissance de leurs substrats qui sont respectivement les lipides II et les Gly-ARNt^{Gly} et l'UM5K et l'Ala-ARNt^{Ala}. Les généralités sur les ARNt de transfert seront détaillées dans la sous partie 4 de cette introduction.

Dès les années 70, l' aminoacyl transférase de la famille Fem de *W. viridescens* (anciennement *Lactobacillus viridescens*) a été étudiée et caractérisée biochimiquement (Plapp et Strominger 1970). Chez *S. aureus*, les transférases de la famille Fem n'ont été identifiées que dans les années 90, grâce à une approche génétique, basée sur l'insertion aléatoire d'un transposon de façon à déterminer les gènes conférant la résistance aux β -lactamines. Cette étude a conduit à l'identification de FemA et FemB, facteurs essentiels pour l'expression de la résistance à la méthicilline (factors essential for methicillin resistance : Fem) dont les gènes sont organisés en opéron (Berger-Bächli et al., 1989). Depuis lors, le terme « transférase de la famille Fem » a été repris et utilisé pour désigner toutes les enzymes ARNt dépendantes synthétisant les chaînes latérales des précurseurs du PG.

3.1. Comparaison de structure des aminoacyl transférases de la famille Fem

Plusieurs structures d' aminoacyl transférases de la famille Fem, obtenues par cristallographie aux rayons X, sont désormais disponibles : les structures partielles de FemA et FmhB (anciennement appelée FemX) de *S. aureus* ainsi que celle de FemX de *W. viridescens* sous forme d'apoenzyme, complexée avec l'UM5K ou en complexe avec une molécule conjuguée peptidyl-ARN (Benson et al., 2002; Biarrotte-Sorin et al., 2004; Fonvielle et al., 2013a; York et al., 2021).

Les Fem transférases possèdent toutes un domaine globulaire composé d'hélices α et de feuilletts β , qui peut être divisé en 2 sous-domaines (1A et 1B) présentant chacun des similarités de repliement tridimensionnel avec le domaine histone acétyltransférase (HAT) des protéines de la superfamille des GCN5-acétyltransférase (GNAT). L'étude des structures disponibles a permis de diviser les transférases Fem en deux sous-groupes basés sur la présence ou l'absence d'un domaine hélicoïdal appelé domaine coiled-coil. Ce domaine présent chez FemA et FmhB et absent chez FemX,

est composé de deux hélices α antiparallèles (**Figure 10**). Il présente une structure similaire à celui des seryl-ARNt-synthétases (SerRS) et pourrait être impliqué dans la reconnaissance des ARNt en servant de plateforme d'interaction. La comparaison de séquences des transférases Fem de *S. aureus* a permis de montrer que FemB possède également un domaine coiled-coil. L'obtention de la structure de FemA, a permis de construire un modèle tridimensionnel de MurM de *S. pneumoniae* qui est également une Fem transférase possédant un domaine coiled-coil. En revanche, chez FemX, l'absence de coiled-coil limite l'interaction de l'ARNt aminoacylé à la partie globulaire de l'enzyme.

Une deuxième différence majeure se situe au niveau de la reconnaissance du second substrat : le lipide II ou l'UM5K. Pour FemA et FmhB, un canal en forme de L à la surface des enzymes qui traverse le sous domaine 1B serait la seule région permettant de fixer un substrat lipidique disaccharide de grande taille (Benson et al., 2002; York et al., 2021). Cette hypothèse reste à confirmer notamment avec l'obtention d'une structure en complexe avec le substrat lipidique. Chez FemX l'UM5K est fixé dans une cavité formée à l'interface des deux sous domaines, et interagit majoritairement avec le domaine 1A (Biarrotte-Sorin et al., 2004).

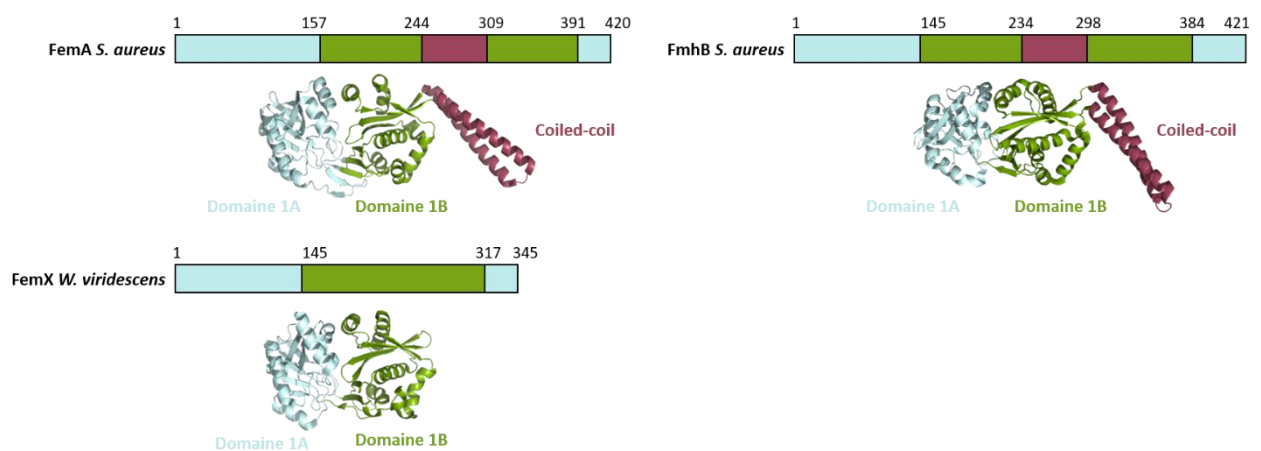


Figure 10 : Comparaison des structures de FemA et FmhB de *S. aureus* et de FemX de *W. viridescens*.

Le domaine globulaire est subdivisé en deux sous domaines 1a (en bleu) et 1B (en vert). Les enzymes de *S. aureus* possèdent un domaine hélicoïdal appelé coiled-coil (en violet). Adaptée de (Mainardi et al., 2008).

3.2. Diversité des transférases de la famille Fem

3.2.1. MurM et MurN de *S. pneumoniae*

Le PG de *S. pneumoniae* est composé à la fois de mucopeptides linéaires et de mucopeptides branchés avec une chaîne latérale de type L-Ser-L-Ala ou L-Ala-L-Ala synthétisée par les enzymes MurM et MurN. Les gènes codant pour ces 2 enzymes sont organisés en opéron, dont l'inactivation, chez les souches de pneumocoques résistantes à la pénicilline, conduit à l'abolition complète de cette résistance (Filipe and Tomasz, 2000).

Les enzymes agissent de façon séquentielle, MurM ajoute le 1^{er} résidu (L-Sérine ou L-Alanine) tandis que MurN ajoute toujours une L-Alanine en position 2. Le gène de codant pour MurN est hautement conservé chez toutes les souches de *S. pneumoniae*. En revanche, l'identité de l'acide aminé en position 1 repose sur la variabilité allélique du gène *murM*, en effet les différents allèles codent pour des protéines différentes sur le plan fonctionnel : l'une ajoutant une L-sérine et l'autre une L-alanine. Le gène *murM* des souches résistantes à la pénicilline possède une structure en mosaïque dans laquelle des séquences conservées alternent avec des séquences divergentes d'origine hétérologue tandis que celui des souches sensibles est hautement conservé. Une plus grande proportion de mucopeptides branchés est retrouvée dans le PG mature des souches résistantes, indiquant qu'elles possèdent un allèle codant pour une enzyme plus efficace. L'étude des séquences des protéines codées par les différents allèles et la construction de protéines MurM chimériques ont permis d'identifier le coiled-coil comme étant la région responsable de la spécificité de substrat et donc de l'acide aminé inséré en position 1 (Filipe et al., 2001, 2000; Fiser et al., 2003)

3.2.2. FemX, FemY et VanK de *Streptomyces coelicolor*

S. coelicolor possède un PG caractérisé par la présence d'un résidu acide L,L-diaminopimélique en position 3 de la tige pentapeptidique (L,L-dpm³) et d'un pont interpeptidique composé d'une unique glycine. C'est une bactérie non pathogène vivant dans le sol, qui ne produit pas de glycopeptides dont fait partie la vancomycine, mais il semble probable qu'elle soit en contact avec des producteurs de cet antibiotique. *S. coelicolor* a donc acquis un cluster de gènes lui conférant une résistance à la vancomycine et donc un avantage sélectif pour croître dans son environnement.

Ce cluster est composé de 7 gènes *vanSRJKHAX*. Le gène *vanK* est particulièrement intéressant car il ne possède aucun homologue au sein des clusters van d'autres pathogènes résistants et il est essentiel à l'expression de la résistance à la vancomycine. Les similarités de séquences de la protéine VanK avec celles de FmhB, FemA et FemB de *S. aureus* ont permis de démontrer qu'elle fait partie de la famille des transférases Fem. Le génome de *S. coelicolor* possède également deux gènes

supplémentaires codant pour des transférases Fem nommées FemX et FemY. Les trois transférases Fem de *S. coelicolor* ne possède pas de domaine coiled-coil (Hong et al., 2004).

En 2005, une étude combinant approches génétiques et biochimiques a permis de préciser la fonction de FemX et VanK. Dans un contexte de croissance sans vancomycine, le cluster de gènes *van* n'est pas exprimé, et FemX catalyse le transfert de la glycine d'un Gly-ARNt^{Gly} sur le L,L-dpm³ de l'UM5K possédant une extrémité terminale D-Ala⁴-D-Ala⁵. En revanche, la présence de vancomycine, provoque l'expression des 7 gènes du cluster et les enzymes VanHAX induisent un changement dans la synthèse du PG de sorte que les précurseurs UM5K se terminent par D-Ala⁴-D-Lac⁵. Dans ce contexte, VanK devient essentielle et synthétise la chaîne latérale, car FemX ne reconnaît plus les précurseurs à D-Ala⁴-D-Lac⁵ (Hong et al., 2005). Le rôle de la dernière transférase de la famille Fem, FemY, reste encore à élucider. Le gène codant pour FemY n'est pas transcrit en présence ou en absence de vancomycine et sa disruption n'entraîne pas d'effet phénotypique (Hong et al., 2005).

3.2.3. BppA1 et BppA2 de *E. faecalis*

Chez *E. faecalis*, la chaîne latérale est synthétisée par deux enzymes de la famille transférase Fem, BppA1 et BppA2 qui catalysent chacune respectivement le transfert de résidus L-Ala, de Ala-ARNt^{Ala} sur la L-Lys³ de l'UM5K. Il a été montré que la délétion du gène *bppA2* entraîne la production de mucopeptides possédant une seule alanine, qui sont de mauvais substrats de la PLP5 de faible affinité, entraînant une réduction de la résistance intrinsèque de cette espèce bactérienne aux β -lactamines (Bouhss et al., 2002).

3.2.4. Transférase de la famille Fem chez le genre *Borrelia*

Borrelia burgdorferi est une bactérie pathogène à Gram négatif qui est l'agent pathogène provoquant la maladie de Lyme. La sous unité de base de son PG est caractérisée par la présence de L-Orn en position 3 de la tige pentapeptidique est d'une chaîne latérale mono-glycine (Jutras et al., 2019). Aucune information n'est disponible sur l'identité de l'enzyme responsable de la synthèse de cette chaîne latérale, bien qu'une protéine candidate ait été annotée dans le génome de *B. burgdorferi* sous plusieurs noms : FemA like ou FemX. Le blast de sa séquence protéique permet de mettre en évidence des protéines ayant jusqu'à 95% d'identité chez d'autres espèces du genre *Borrelia*. A ce jour, le genre *Borrelia*, serait le seul des bactéries à Gram négatif à posséder des enzymes de type transférases Fem.

3.2.5. FemX chez *W. viridescens* : Fem modèle ne possédant pas de domaine coiled-coil

La synthèse de la chaîne latérale L-Ala-L-Ser ou L-Ala-L-Ser-L-Ala chez *W. viridescens* a lieu au niveau de l'UM5K. *W. viridescens* étant naturellement résistante aux glycopeptides, les précurseurs du PG possèdent des extrémités D-Ala⁴-D-Lac⁵ (Maillard et al., 2005). FemX catalyse le transfert d'un résidu Ala d'un Ala-ARNt^{Ala} sur la L-Lys³ de l'UM5K, tandis que les résidus suivants sont ajoutés par des aminoacyl transférases de la famille Fem encore inconnues. Le fait que FemX soit une enzyme soluble, possède un substrat non lipidique UM5K et soit capable d'utiliser les ARNt de *E. coli* en a fait un modèle pour l'étude des transférases de la famille Fem ne possédant pas de coiled-coil (Hegde and Blanchard, 2003; Hegde and Shrader, 2001).

Plusieurs études basées sur la structure de FemX ont permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes de reconnaissance des deux substrats de l'enzyme.

Reconnaissance de l'UM5K

Des tests d'activité *in vitro* de FemX ont été réalisés pour identifier les régions de l'UM5K importantes pour sa reconnaissance. Plusieurs molécules analogues de l'UM5K ont été testées comme substrat. Il a été démontré que l'activité de FemX était drastiquement réduite avec de l'UM5K déplété de son phosphate α ou du résidu terminal de sa tige peptidique, et abolit en présence de MurNAc-pentapeptide ou UDP-MurNAc-tripeptide qui ne sont donc pas substrats de FemX. Ces résultats ont permis de souligner l'importance des résidus D-Ala⁴-D-Lac⁵ et des phosphates de l'UM5K qui sont en interaction avec de nombreux résidus de la protéine, qui participent au maintien du substrat dans une conformation optimale pour l'activité de l'enzyme (Maillard et al., 2005). Il a également été montré que FemX utilisait aussi efficacement des précurseurs possédant des extrémité D-Ala⁴-D-Lac⁵ ou D-Ala⁴-D-Ala⁵.

Reconnaissance de l'ARNt aminoacylé

La spécificité de substrats de FemX pour différents ARNt aminoacylés a été étudiée et a conduit à l'identification des bases essentielles à la reconnaissance des ARNt par FemX. Les résultats de cette étude ont montré que FemX était hautement spécifique pour les ARNt spécifiant l'alanine *in vivo* bien que les Gly-ARNt^{Gly} et Ser-ARNt^{Ser} soient tolérés par l'enzyme *in vitro*. L'extraction d'ARNt naturels issus de différentes bactéries à Gram positifs a confirmé ses résultats et la meilleure activité a été obtenue avec les Ala-ARNt^{Ala} extraits de *W. viridescens*. La synthèse de dérivés d'ARNt spécifiant l'alanine a permis d'identifier le bras accepteur comme étant le substrat minimal de FemX. La mutagénèse à saturation de ce bras accepteurs a permis d'identifier les bases C⁷¹ et C⁷² comme indispensables à

l'activité de FemX, et a confirmé que le mésappariement $G^3 \bullet U^{70}$ précédemment identifié est le déterminant principal de l'alanyl-ARNt-synthétase (mais qu'il joue pas de rôle dans la spécificité de substrat de FemX) (**Figure 11**) (Francklyn and Schimmel, 1989; Villet et al., 2007).

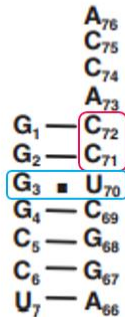


Figure 11 : Duplex ARNt : substrat minimal de la réaction couplée AlaRS/FemX.

Les bases importantes pour l'activité de FemX sont encadrées en rouge, tandis que celles régissant la reconnaissance par l'alanyl-ARNt-synthétase sont encadrées en bleu. Adaptée de (Villet et al., 2007).

Des études complémentaires ont permis de montrer que les bases C^{71} et C^{72} sont impliquées dans la discrimination des ARNt spécifiant l'alanine des ARNt spécifiant la glycine. Cette reconnaissance base-spécifique permet d'exclure l'incorporation de glycine dans la chaîne latérale tandis que l'exclusion des acides aminés possédant une chaîne latérale plus volumineuse que l'alanine, par exemple la sérine, repose plutôt sur un mécanisme d'exclusion stérique dans le site catalytique de FemX (Fonvielle et al., 2009).

Mécanisme catalytique

La synthèse de molécules telles que des hélices aminoacylées chimiquement mimant le bras accepteur de l'ARN^{Ala}, ou des inhibiteurs conjugués peptidyl-ARN ont permis de proposer un mécanisme catalytique pour FemX qui est le suivant.

Il a été montré que FemX utilise préférentiellement des régioisomères 2'-Ala-ARNt^{Ala} (notion de régioisomère abordée dans le paragraphe 4.5). Dans le site catalytique de FemX, l'amine libre de la L-Lys de l'UM5K attaquerait la liaison ester reliant l'ARNt et l'alanine (étape d'addition), provoquant l'apparition d'un intermédiaire réactionnel oxyanion. Cet intermédiaire serait stabilisé par la Lys catalytique 305. Lors de l'étape d'élimination, la charge négative de l'oxyanion reformerait le carbonyle et permettrait la libération de l'ARNt et de l'UM5K portant le résidu alanine (**Figure 12**). (Fonvielle et al., 2013a, 2010)

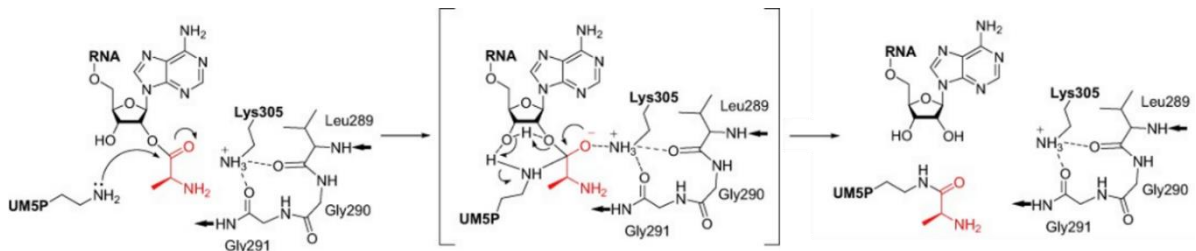


Figure 12 : Mécanisme catalytique proposé pour FemX.

Issue de (Fonvielle et al., 2013a).

3.2.6. Les transférases de la famille Fem chez *S. aureus*

Chez *S. aureus* la chaîne latérale des précurseurs du PG est composée de cinq glycines. Trois enzymes sont impliquées dans la synthèse de la chaîne latérale et catalysent le transfert d'une glycine d'un Gly-ARNt^{Gly} sur le substrat lipidique (Schneider et al., 2004) (**Figure 13**). Deux des enzymes responsables de la synthèse de cette chaîne pentaglycine ont été découvertes dans le cadre d'un crible visant à caractériser les gènes conférant la résistance aux β -lactamines à la bactérie. Ce crible a permis d'identifier deux gènes organisés en opéron, qui ont été nommés *femA* et *femB* pour facteurs essentiels pour l'expression de la résistance à la méthicilline (Berger-Bächli, 1983; Berger-Bächli et al., 1989, 1986). Un troisième gène nommé *FmhB* (anciennement FemX) a été identifié plus tard dans le génome de *S. aureus* (Rohrer et al., 1999; Tschierske et al., 1999).

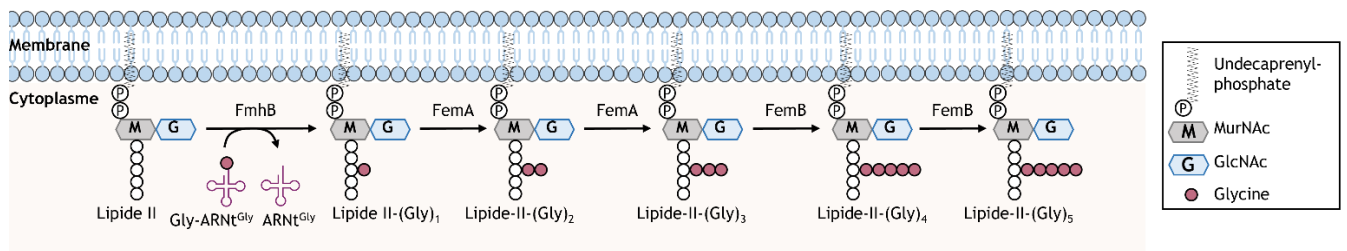


Figure 13 : Synthèse de la chaîne latérale pentaglycine chez *S. aureus*.

Etudes phénotypiques : déplétions de *FmhB*, *FemA* et *FemB*

Il a été démontré que l'inactivation par insertion d'un transposon dans le gène *femA* ou le gène *femB* mène à une réduction de 40% de glycine dans le PG mature, qui est associée à une réduction du taux de réticulation du PG, une croissance anormale, et une perte de résistance à la méticilline (Berger-Bächli et al., 1989; Henze et al., 1993). De plus, la construction d'un mutant nul pour l'opéron *femAB* associée à de la complémentation fonctionnelle et l'analyse du PG de ces souches a permis de préciser

les fonctions de ces enzymes. Il a été montré que FemA est responsable de l'ajout des glycines en position 2 et 3 de la chaîne latérale tandis que FemB ajoute les glycines 4 et 5 (Strandén et al., 1997). Elles ne peuvent pas se substituer l'une à l'autre et sont donc hautement spécifiques de leurs substrats respectifs. L'absence de FemA et FemB mène également à une réduction de l'amidation du résidu D-iGlu² et une résistance à la lysostaphine, une glycyglycine endopeptidase (Ehlert et al., 1997; Kopp et al., 1996). Dans des études complémentaires, la construction de mutants déletés des gènes codant pour *femA* ou *femB* s'est montrée impossible, suggérant que l'opéron *femAB* est en fait essentiel à la viabilité de la bactérie et que le mutant nul pour *femAB* avait acquis des mutations compensatoires afin d'assurer sa survie (Hübscher et al., 2007; Ling and Berger-Bächi, 1998).

Une étude plus récente a finalement prouvé que la déplétion de l'opéron *femAB* est létale et mène à la disruption de l'enveloppe de la bactérie soit (i) car les mucopeptides mono-glycyle ne sont pas substrats des PLP soit (ii) car la chaîne latérale est trop courte et ne permet pas à deux mucopeptides adjacents d'être liés. Ils ont également montré que FemA est localisée à la membrane cytoplasmique et que l'activité enzymatique de FemA n'est pas nécessaire pour sa localisation (**Figure 14**) (Monteiro et al., 2019).

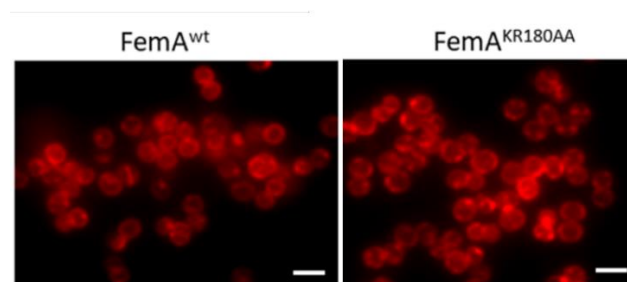


Figure 14 : Localisation de FemA à la membrane cytoplasmique de *S. aureus*.

FemA_{WT} et FemA^{KR180AA}, une protéine mutante incapable d'interagir avec l'ARNt donc ne possédant pas d'activité, sont localisées à la membrane. Adaptée de (Monteiro et al., 2019).

L'enzyme FmhB a été identifiée plus tard et a également été montrée comme essentielle. La construction d'un mutant conditionnel pour l'expression de FmhB a permis de confirmer qu'elle catalyse l'ajout de la 1^{ère} glycine de la chaîne latérale sur la L-Lys³ des précurseurs du PG. La réduction de son expression a conduit à une réduction de la réticulation du PG, et à une augmentation de la proportion de mucopeptides non amidés dans le PG mature. Le lien entre le niveau d'amidation et la présence de pont interpeptidique pentaglycine n'est pas encore connu (Rohrer et al., 1999).

Spécificité de substrats lipidiques des transférases Fem

La purification des enzymes ainsi que des intermédiaires lipidiques possédant un groupement bactoprénol a permis d'aller plus loin dans la compréhension du mécanisme de synthèse de la chaîne latérale pentaglycine. Le développement d'un test d'activité *in vitro* permettant de suivre l'incorporation de glycine radiomarquée a permis de mettre en évidence que FmhB/FemA/FemB sont hautement spécifiques pour le lipide II et n'utilisent ni l'UM5K ni le lipide I comme substrat (**Figure 15**). Les enzymes pourraient donc reconnaître leurs substrats lipidiques via leurs motifs disaccharidiques (MurNAc-GlcNAc), et les discriminer avec le nombre de glycines qu'ils possèdent (Schneider 2004).

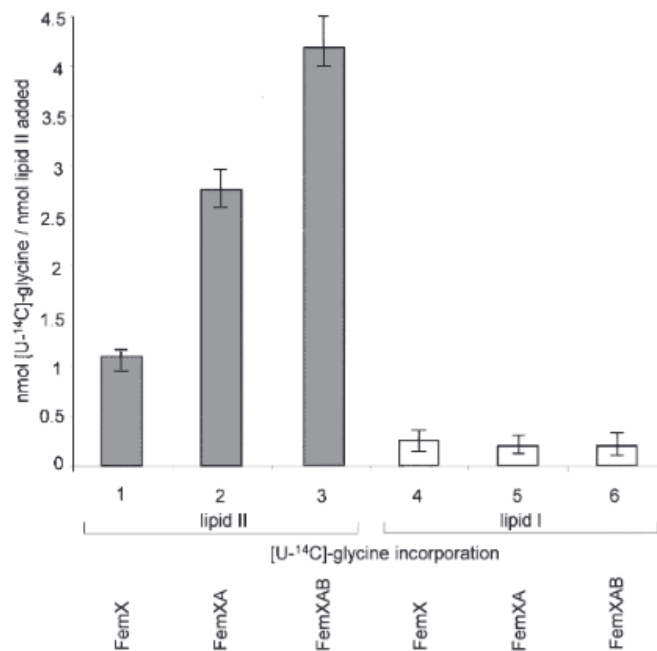


Figure 15 : Spécificité de substrats lipidiques de FmhB (ici annotée FemX), FemA et FemB de *S. aureus*.

Les enzymes FmhB, FemA et FemB incorporent de la glycine radiomarquée uniquement sur le lipide II (panel de gauche). Le lipide I n'est pas substrat des enzymes (panel de droite). Issues de (Schneider et al. 2004).

Une autre étude a montré que FemA et FemB peuvent former des homodimères (FemA-FemA ou FemB-FemB) ainsi que des hétérodimères (FemA-FemB) alors que FmhB est seulement trouvée sous forme de monomère. Ces résultats semblent indiquer que FemA et FemB pourraient coopérer et ajouter quatre résidus glycines sans que les lipides intermédiaires soient libérés dans le cytoplasme (Rohrer and Berger-Bächli, 2003).

La spécificité de substrat de FmhB a été étudiée plus en détail, dans le cadre de la résistance à la vancomycine. Les 1^{ères} souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine (VRSA) ont été observées dans les années 2000. La résistance à la vancomycine peut être la conséquence (i) de l'épaississement de la paroi et donc de l'augmentation du nombre de résidus D-Ala⁴-D-Ala⁵ pouvant séquestrer l'antibiotique en périphérie et l'empêcher d'atteindre les PLP ou (ii) de l'acquisition de l'opéron *vanA* de *Enterococcus spp* encodé par un transposon qui induit un changement de structure du PG dont les résidus terminaux sont désormais D-Ala⁴-D-Lac⁵. Bien que l'apparition de ces souches restent pour l'instant confinée en milieu hospitalier, leur diffusion reste préoccupante (Périchon and Courvalin, 2009). Une étude a donc été publiée afin d'étudier la spécificité de substrat de FmhB pour les précurseurs du PG avec une extrémité terminale à D-Ala⁴-D-Lac⁵. Il a été montré que FmhB possède une efficacité catalytique réduite de 5 à 7 fois pour des analogues de substrats possédant des résidus D-Ala⁴-D-Lac⁵ à la place des résidus D-Ala⁴-D-Ala⁵, et qu'elle est donc capable de discriminer les deux molécules (**Figure 16**). Cette réduction d'activité de FmhB, entraîne une réduction de la synthèse du PG et a donc un coût énergétique trop important pour la survie de la bactérie, ce qui pourrait expliquer la faible dissémination des souches de *S. aureus* résistantes à la vancomycine (Fonvielle et al., 2018).

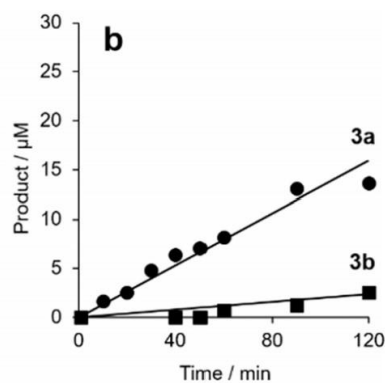


Figure 16 : Activité catalytique de FmhB avec des analogues de substrats lipidiques.

Les données pour les analogues possédant une extrémité D-Ala⁴-D-Ala⁵ ou D-Ala⁴-D-Lac⁵ sont respectivement représentés par les ronds et les carrés. Issue de (Fonvielle et al., 2018)

Ces nombreuses études indiquent que les transférases FmhB, FemA et FemB sont hautement spécifiques de leurs substrats lipidiques respectifs, et que les discriminants régissant ces spécificités sont multifactoriels et restent encore à identifier.

Spécificité de substrat des Fem transférases pour les ARNt

Dès les années 1960, les molécules donneuses de glycine et participant à la synthèse de la paroi ont été identifiées comme étant les ARNt aminoacylés (Matsuhashi et al., 1967, 1965).

Le génome de *S. aureus* contient 7 gènes codant pour 5 isoaccepteurs d'ARNt^{Gly} qui sont des ARNt spécifiant le même acide aminé au niveau de la boucle de l'anticodon (Glycine) mais possédant des séquences différentes (Giannouli et al., 2009). Trois d'entre eux, organisés en cluster, possèdent des caractéristiques particulières et des séquences similaires à deux Gly-ARNt^{Gly} de *Staphylococcus epidermidis* qui ont été montrés comme impliqués dans la synthèse du PG et non dans celle des protéines (Green and Vold, 1993; Roberts, 1974, 1972; Roberts et al., 1974). Chez *S. aureus*, une étude a montré que 3 fractions différentes de Gly-ARNt^{Gly} purifiées par chromatographie étaient capables de participer à la synthèse du PG et deux d'entre elles à la synthèse protéique (Bumsted et al., 1968). Leurs séquences n'ont pas pu être obtenues mais il est probable que ces 3 fractions correspondent aux Gly-ARNt^{Gly} codés par les 3 gènes organisés en cluster identifiés plus tard.

Une autre étude basée sur l'analyse des génomes de *S. aureus* disponibles, a ensuite permis d'obtenir les séquences des cinq Gly-isoaccepteurs. Giannouli *et al* ont identifié des différences de séquences entre les isoaccepteurs et ont pu mettre en évidence une différence d'affinité de EF-Tu pour ces 5 isoaccepteurs. Ils les ont classés en 2 groupes : les ARNt^{Gly} protéogéniques (P1 et P2) qui possèdent une forte affinité pour le facteur d'élongation EF-Tu et qui participeraient donc à la synthèse protéique, et les ANRt^{Gly} non-protéogéniques (NP1, NP2 et NP3) qui possèdent une moins bonne affinité pour EF-Tu et qui seraient préférentiellement dirigés vers la voie de synthèse pariétale (Giannouli et al., 2009).

Ces recherches ont permis de poser une hypothèse sur le partitionnement des différents isoaccepteurs entre les processus de synthèse pariétale et synthèse protéique bien qu'aucune preuve directe n'ait été publiée sur l'interaction ni la reconnaissance des ARNt par les transférases Fem.

FmhA et FmhC

S. aureus possèdent également deux autres transférases de la famille Fem nommées FmhA et FmhC. Les déplétions des gènes codant pour ces protéines n'entraînent aucun impact sur la structure du PG, sur la croissance des bactéries ni sur le phénotype de résistance aux antibiotiques (Tschierske et al., 1999). Le rôle de ces enzymes a récemment été identifié et il a été montré que la surexpression de FmhA permet l'incorporation de sérine en position 3 et 5 de la chaîne latérale tandis que la surexpression de FmhC mène à l'insertion de sérine uniquement en position 5. La présence de FmhA et FmhC chez *S. aureus* est assez surprenante étant donné que l'incorporation de sérine dans les ponts

interpeptidiques est assez rare. Les niveaux basaux d'expression de FmhA et FmhC sont encore inconnus. L'incorporation de sérine dans les ponts peptidiques pourraient conférer à la bactérie un avantage sélectif, et protéger le PG du clivage par des bactériocines (telles que la lysostaphine) produites par des bactéries compétitrices (**Figure 17**) (Willing et al., 2020).

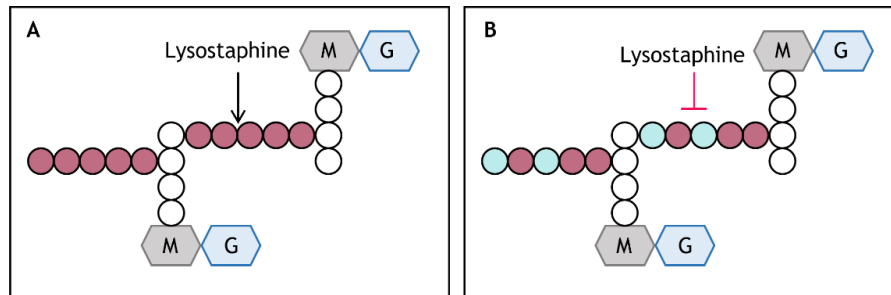


Figure 17 : Structure du PG et site de clivage de la lysostaphine.

Comparaison du PG de *S. aureus* sans (A) ou (B) avec la surexpression de FmhA et FmhC. Les résidus glycyloxy et sérilyloxy sont respectivement représentés par les cercles violets et bleus. Le site d'hydrolyse de la lysostaphine est représenté par une flèche.

3.3. Inhibiteurs des transférases de la famille Fem

Les transférases Fem étant des enzymes essentielles de la synthèse du PG, elles représentent des cibles intéressantes pour le développement de nouvelles molécules antibactériennes. Plusieurs approches basées sur la synthèse (i) de molécules mimant l'intermédiaire réactionnel de haute énergie (ii) d'analogues de substrats (iii) ou de molécules bi-substrats ont été développées afin de synthétiser des inhibiteurs des transférases de la famille Fem.

3.3.1. Inhibiteur mimant l'intermédiaire réactionnel de haute énergie.

Une étude menée sur le mécanisme catalytique de MurM de *S. pneumoniae* a permis le développement d'une série de molécules inhibitrices (analogues phosphonates de l'adénosine terminale de l'ARNt) pouvant mimer un intermédiaire tétraédrique de haute énergie (**Figure 18A**). Dans cette étude, les auteurs ont essayé de concevoir et de synthétiser un mime d'intermédiaire tétraédrique basé sur l'incorporation d'un résidu méthyl phosphonate en position 3' d'une 2'-déoxyadénosine. Malheureusement, testé *in vitro*, ce composé n'a présenté qu'une capacité limitée d'inhibition de MurM avec un IC_{50} de 100 μ M (**Figure 18B**). Testée *in vivo*, cette molécule n'a montré aucune activité antibactérienne à 1mM (380 μ g.mL⁻¹) (Cressina et al., 2007).

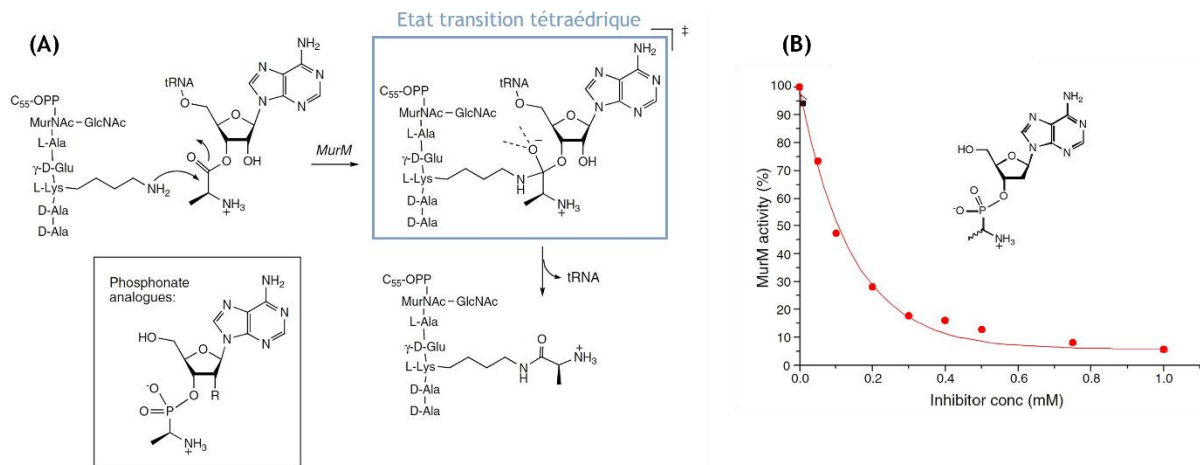


Figure 18 : Inhibiteur de MurM mimant son état de transition tétraédrique

(A) Mécanisme catalytique de MurM. Intermédiaire de transition de haute énergie (tétraédrique) est indiqué dans l'encadré bleu. La structure de l'inhibiteur analogue phosphonate est encadrée en noir (R=H). **(B)** Inhibition de MurM par cette molécule. (Adaptée de Cressina et al. 2007)).

3.3.2. Analogues de substrats

Une autre stratégie abordée pour le développement d'inhibiteurs a consisté à synthétiser un analogue de substrat ARNt aminoacylé. Cette étude a été menée sur FemX de *W. viridescens* et a montré qu'une microhélice de 24 nucléotides mimant le bras accepteur de l'ARNt, possédant un cycle 1,2,4-oxadiazole mimant la liaison ester en 3' de l'adénosine terminale de l'ARNt amino acylé, a présenté des capacités d'inhibition de FemX avec une constante d'inhibition (K_i) de 1,4 μM proche du K_m de l'Ala-ARNt^{Ala} (1,7 μM) déterminé lors d'une étude précédente (**Figure 19**) (Chemama et al., 2007; Maillard et al., 2005). Le motif oxadiazole peut donc être considéré comme un bio-isostère d'ester dans le contexte de ces ARNt aminoacylés et il présente l'avantage d'être très stable, notamment vis-à-vis de conditions d'hydrolyse acide ou basique.

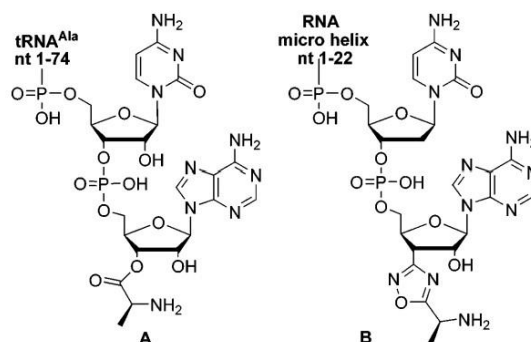


Figure 19 : Molécule inhibitrice analogue d'Ala-ARNt^{Ala}.

La molécule A est le substrat naturel (Ala-ARNt^{Ala}) et la molécule B est l'analogue stable de substrat. Issue de (Chemama et al., 2007)

3.3.3. Inhibiteur de type bi-substrat

Une dernière approche, qui a été développée par mon équipe d'accueil, est basée sur l'hémisynthèse d'une molécule dite bi-substrat (BS) qui réunit en une unique molécule les deux partenaires des transférases Fem, l'ARNt et le précurseur du peptidoglycane.

Inhibiteur de FemX

Une étude réalisée sur FemX de *W. viridescens* a mené à l'identification d'une molécule possédant une capacité d'inhibition *in vitro* très puissante de l'ordre de quelques dizaines de picomolaires ($IC_{50} = 89 \pm 9 \text{ pM}$). Cette molécule est composée d'une microhélice de 24 nucléotides (mimant le bras accepteur de l'ARNt) liée de manière covalente par un cycle triazole à un analogue d'UM5K possédant une cystéine fonctionnalisée mimant la chaîne latérale d'une lysine en position 3 de la tige pentapeptidique (**Figure 20**) (Fonvielle et al., 2013b).

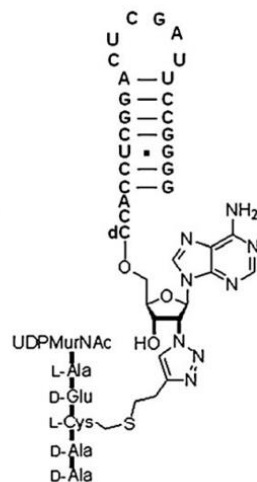


Figure 20 : Structure de la molécule bi-substrat inhibitrice de FemX de *W. viridescens*.
Issue de (Fonvielle et al., 2013b)

Inhibiteurs de FmhB

Une stratégie similaire a été adoptée pour la synthèse d'inhibiteur de FmhB de type bi-substrat (BS), mais la partie ARN (de 18 nucléotides) a été obtenue par synthèse sur support solide de façon à incorporer un groupement hexa-éthylène glycol à la place de la boucle de la microhélice. Cet ARN de synthèse a été lié de manière covalente à un analogue de lipide II possédant un motif neryl (di-prenyl) ou heptaprenyl (**Figure 21**) de façon à obtenir des molécules avec des solubilités variables. Les IC_{50} obtenus *in vitro* ont été respectivement de 56 ± 6 et $5 \pm 3 \text{ nM}$ pour les BS possédant un motif neryl ou

heptaprenyl soulignant un effet important de la partie lipidique sur l'affinité de FmhB pour les inhibiteurs (Fonvielle et al., 2018).

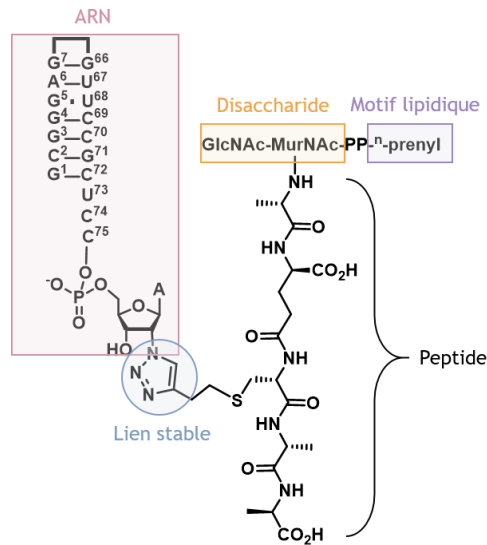


Figure 21 : Structure des molécule bi-substrats inhibitrices de FmhB de *S. aureus*.
n = 2 (neryl) ou n = 7 (heptaprenyl). Issue de (Fonvielle et al., 2018)

Ces molécules BS présentent l'avantage de pouvoir également être utilisées comme outils biochimiques afin de répondre à des questions d'ordre fondamental notamment sur l'impact de modifications chimiques sur l'un, l'autre ou les deux des partenaires des transférases de la famille Fem.

Toutes ces données sur les inhibiteurs sont à ce jour les seules disponibles sur la synthèse d'inhibiteurs ciblant les transférases de la famille Fem et sont très prometteuses bien qu'aucune molécule possédant un effet antibactérien *in vivo* n'ait été décrite dans la littérature. Leur utilisation en tant que molécules antibactériennes est encore limitée de par leurs propriétés physico-chimiques (polyanions), leur sensibilité à la dégradation par les nucléases et leur faible capacité de pénétration dans le cytoplasme bactérien.

4. Les ARN de transfert (ARNt)

Les ARNt aminoacylés sont majoritairement connus pour être des acteurs essentiels de la synthèse protéique. Néanmoins ils jouent également un rôle dans de nombreux autres processus cellulaires chez les bactéries tels que la synthèse et la modification de la paroi bactérienne (notamment via la synthèse des chaînes latérales permettant la réticulation du PG), la biosynthèse d'antibiotiques, la synthèse d'acides aminés ou encore le marquage des protéines qui seront dirigées vers les voies de dégradation (**Figure 22**) (Shepherd and Ibba, 2013).

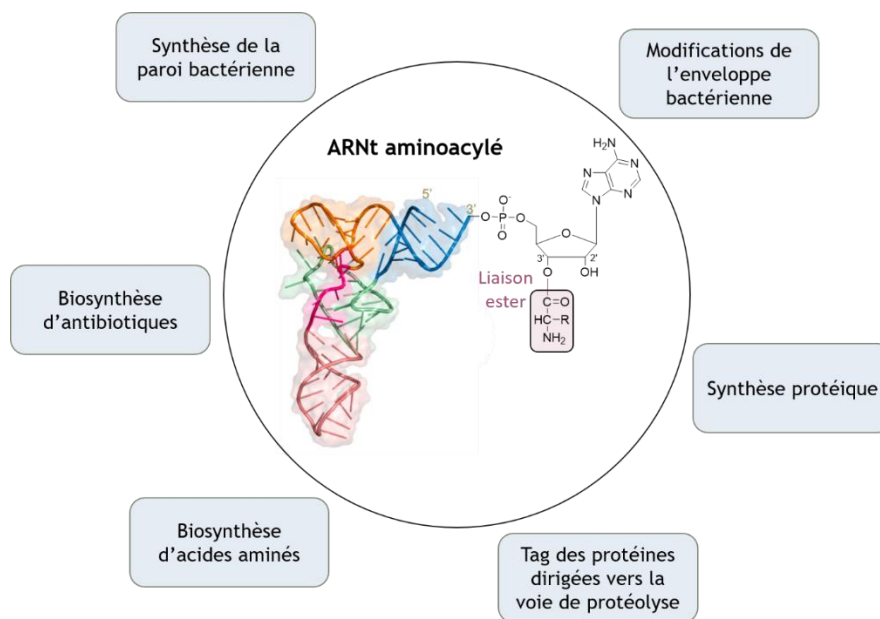


Figure 22 : Participation des ARNt aminoacylés dans diverses voies métaboliques chez les bactéries. Les voies métaboliques sont encadrées en bleu. L'acide aminé porté par l'ARNt (encadré en rose) est lié par une liaison ester en position 3' du ribose de l'adénosine terminale. Adaptée de (Moutiez et al., 2017).

4.1. Structure des ARNt

Les ARNt ont une taille variable allant de 75 à 90 nucléotides. La séquence nucléotidique varie d'un ARNt à l'autre mais est toujours composée de 4 ou 5 répétitions inversées impliquées dans la formation de tiges-boucles, essentielles au repliement des ARNt (Shepherd and Ibba, 2015). Les ARNt sont souvent représentés sous leur forme secondaire dites en feuille de trèfle. Ils sont composés de plusieurs régions bien distinctes : le bras accepteur qui porte l'acide aminé à son extrémité 3' au niveau du CCA terminal, la tige et la boucle D (qui porte souvent une modification appelée dihydrouridine, d'où son nom), la tige-boucle de l'anticodon, une région variable, et enfin la boucle et la tige T (portant souvent une pseudouridine Ψ). Dans la structure tertiaire de l'ARNt les boucles D et T sont en

interaction et permettent la formation d'une structure en forme de L, avec la tige-boucle de l'anticodon à une extrémité et le bras accepteur avec son CCA terminal à l'autre. Dans le processus de synthèse protéique, l'anticodon majoritairement trouvé en position 34, 35 et 36 reconnaît un codon spécifique situé sur l'ARN messager (ARNm) dans le site A du ribosome (**Figure 23**) (Suzuki, 2021).

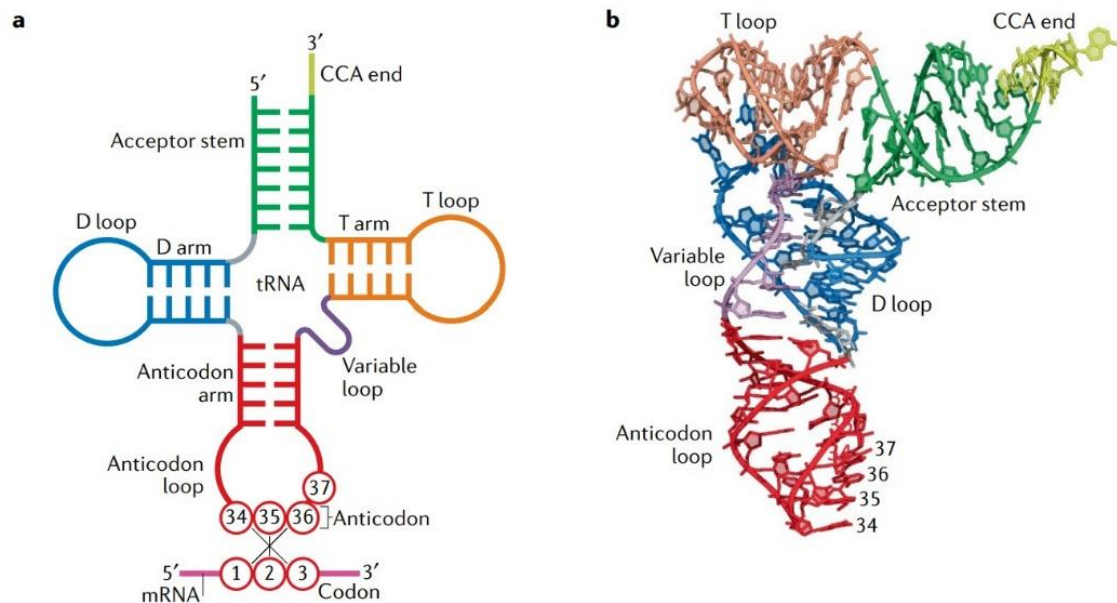


Figure 23 : Structure des ARNt.

(a) Représentation en forme de feuille de trèfle, structure secondaire. (b) Représentation tridimensionnelle d'un ARNt, les boucles D et T sont en interaction. Issu de (Suzuki, 2021).

4.2. Synthèse des ARNt chez les procaryotes

Chez les procaryotes, les gènes codant pour les ARNt sont généralement trouvés dans des clusters comprenant également des gènes codant pour les ARNr ribosomiaux (ARNr) ou des protéines spécifiques (comme le facteur d'élongation EF-Tu). Les gènes codant pour les ARNt ont une taille allant de 75 à 90 nucléotides. Chez *E. coli* ils comprennent déjà la séquence critique CCA à leur extrémité 3'. Chez d'autres espèces bactériennes, certains des ARNt ne possèdent pas cette extrémité CCA terminale, qui sera alors ajoutée après la transcription lors de l'étape final de maturation par une nucléotidyl-transférase (Xiong and Steitz, 2004). Chez *E. coli* et *Mycobacterium capricolum*, toutes les régions en amont des clusters contiennent les séquences -10 et -35, motifs caractéristiques du promoteur procaryote, reconnus par l'ARN polymérase.

La synthèse des ARNt démarre par une étape de transcription des gènes catalysée par l'ARN polymérase afin de générer les précurseurs des ARNt qui sont généralement plus longs que les ARNt matures. Ces précurseurs subissent ensuite différentes étapes de maturation. La ribonucléoprotéine RNase P est responsable du « processing » et de la maturation de l'extrémité 5'. Mais dans le cas où le transcrit est polycistronique d'autres endoribonucléases (la RNase E et la RNase III) sont requises pour générer des précurseurs de plus petite taille avant qu'ils ne soient pris en charge par la RNase P. Les RNases E, III, II, BN, D, PH sont quant-à-elles impliquées dans la maturation de l'extrémité 3' (**Figure 24**) (Shepherd and Ibba, 2015).

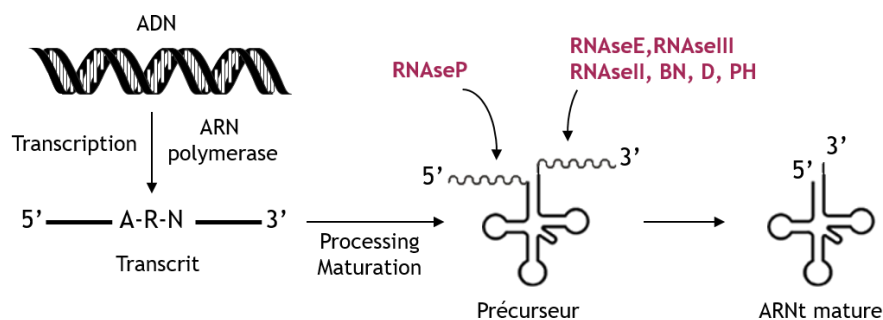


Figure 24 : Synthèse d'un ARNt chez les procaryotes.

Les enzymes impliquées dans le « processing » et la maturation sont indiquées en bordeaux. Adaptée de (Shepherd and Ibba, 2015)

4.3. Modifications post-transcriptionnelles

Après leur synthèse, les ARNt peuvent subir une ou plusieurs étapes de modifications post-transcriptionnelles. Les nucléosides modifiés sont impliqués dans la stabilité des ARNt, l'interaction avec d'autres macromolécules, ou encore dans le décodage des ARNm pendant la traduction. La nature des modifications dépend des espèces étudiées et certaines sont conservées à travers les différents domaines du vivant.

Chez les procaryotes les modifications les plus souvent retrouvées et conservées à travers les différents ARNt sont la dihydrouridine (D) et la 2'-O-méthylguanosine (Gm) au niveau de la tige-boucle D, la 5-méthyluridine (m^5U) et pseudouridine (Ψ) dans la tige-boucle T, la 4-thiouridine (s^4U) dans la tige liant le bras accepteur à la tige-boucle D, la 5-méthoxyuridine (mo^5U) et enfin l'acide uridine-5-oxyaéctique (cmo^5U) au niveau de l'anticodon à la position 34. Chez les bactéries à Gram positif, les nucléosides modifiés peuvent représenter jusqu'à 6,5% des résidus totaux des ARNt (Machnicka et al., 2014).

Chez *S. epidermidis*, il existe également deux isoaccepteurs spécifiant la glycine qui seraient dédiés à la synthèse du PG. L'analyse des séquences de ces ARNt a permis de montrer qu'ils possèdent notamment un très faible taux de bases modifiées, et qu'ils n'ont pas de pseudouridine habituellement retrouvée en position 55 mais ont une 4-thiouridine (4tU désormais nommée s4U) en position 8 et une dihydrouridine (D) en position 19 (Roberts, 1974, 1972).

Plus récemment, une autre équipe de recherche a étudié le profil des modifications post-transcriptionnelles des ARNt de *S. aureus*. Grâce à une technique d'électrophorèse couplée à une méthode d'analyse en spectrométrie de masse, ils ont pu construire un atlas des modifications retrouvées dans l'ensemble des séquences des ARNt de cette bactérie (**Figure 25**). Concernant les isoaccepteurs spécifiant la glycine, de la mo⁵U a été trouvée en position 34 uniquement dans la séquence d'un des deux isoaccepteurs protéogéniques (participant à la synthèse protéique). Cette modification est trouvée chez les bactéries à Gram positif et jouerait un rôle dans la fidélité de traduction par le ribosome et le décodage des ARN messagers (Antoine et al., 2019). Les séquences des ARNt non protéogéniques étant trop proches les unes des autres, il leur a été impossible de les distinguer dans leur analyse. Néanmoins aucune modification n'a pu être mise en avant et c'est à ce jour la seule information disponible sur les modifications post-transcriptionnelles de ces ARNt (Antoine, 2021).

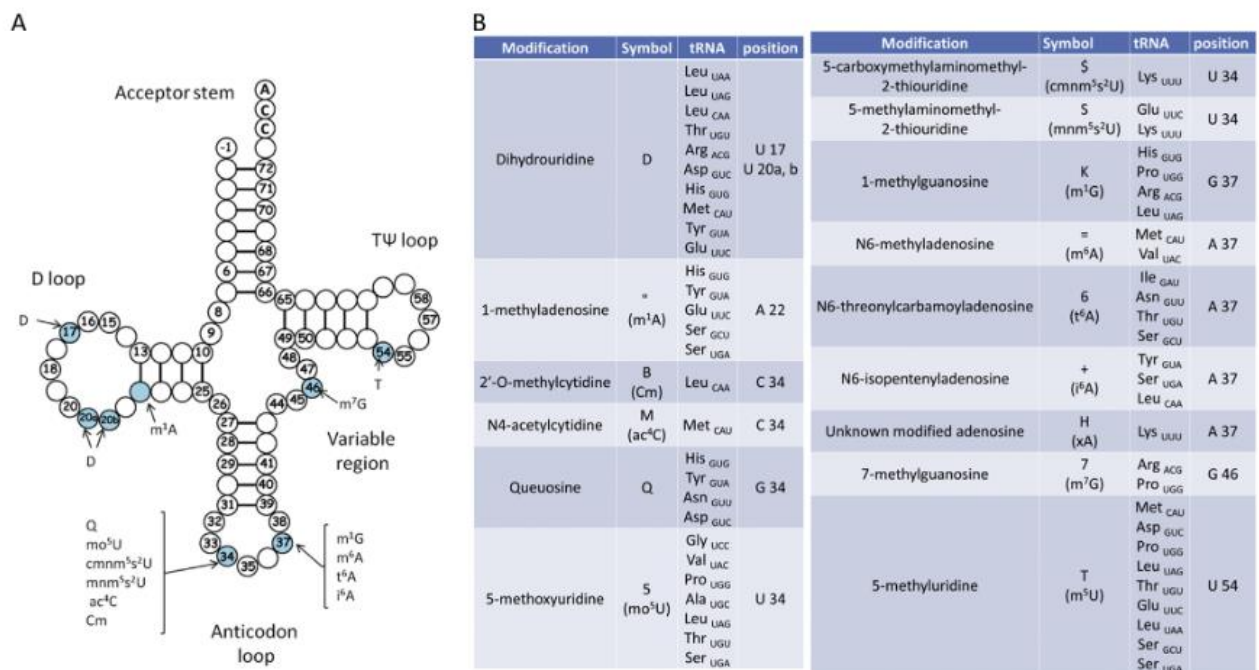


Figure 25 : Atlas des modifications post-transcriptionnelles des ARNt de *S. aureus*.

De la 5-methoxyuridine est retrouvée en position 34 d'un ARNt^{Gly} protéogénique. Issue de (Antoine et al., 2019).

4.4. Aminoacylation des ARNt

Une fois les ARNt matures synthétisés, ils sont aminoacylés par les aminoacyl-ARNt-synthétases (aaRS) qui sont des enzymes essentielles. Leur rôle est de lier de façon covalente un acide aminé à son ARNt correspondant. Sur la base de leurs propriétés chimiques, de la structure de leur domaine catalytique et de leurs séquences consensus, elles sont divisées en deux classes (I et II), qui sont-elles même subdivisées. Les aaRS de classe I aminoacylent préférentiellement l'ARNt en position 2' du ribose de l'adénosine terminale, tandis que celles de classe II aminoacylent la position 3' (**Figure 26**) (de Farias and Guimarães, 2008).

Eléments d'identités reconnus par les aaRS

La reconnaissance des différents isoaccepteurs par les aaRS résulte d'une combinaison d'éléments d'identités qui peuvent être des nucléotides ou des éléments structuraux favorisant l'interaction spécifique de l'aaRS à son substrat et donc une acylation correcte (éléments positifs dits déterminants) ou au contraire permettant d'empêcher ou de limiter les réactions d'amination non spécifiques (éléments négatifs dits anti-déterminants). Les bases 35, 36 et 37 de l'anticodon qui sont très souvent modifiées post-transcriptionnellement constituent un des éléments d'identités majeurs permettant aux aaRS de discriminer les différents ARNt (Rubio Gomez and Ibba, 2020). Les variations de séquences du bras accepteur, la base discriminante en position 73 ainsi que les modifications post-transcriptionnelles jouent également un rôle dans l'amination spécifique et efficace des ARNt (Suzuki, 2021). Les aaRS peuvent également discriminer les différents acides aminés notamment via des mécanismes d'exclusion de taille ou de charges. Afin de prévenir l'utilisation d'ARNt mésacylés (ARNt portant un acide aminé différent de celui spécifié par l'anticodon) dans les diverses voies métaboliques, les aaRS possèdent également des activités de relecture et de correction permettant de dissocier l'ARNt et l'acide aminé mal associés.

Cas particulier de la Glycyl-ARNt-synthétase (GlyRS)

Une étude menée sur la glycyl-ARNt-synthétase (GlyRS), aaRS de classe II, a permis d'identifier les éléments reconnus par l'enzyme, qui sont conservés chez tous les procaryotes : les paires de bases G¹-C⁷² ; C²-G⁷¹ situées dans le bras accepteur ; les bases C³⁵ et C³⁶ de l'anticodon et la base discriminante U⁷³ (Nameki et al., 1997). Chez *S. aureus* tous les isoaccepteurs (NP et P) spécifiant la glycine comportent ces éléments, ne laissant pas supposer une différence de niveau d'amination entre les différents ARNt par l'unique GlyRS présente chez cette bactérie (**Figure 28**) (Giannouli et al., 2009).

4.5. Réactivité des ARNt aminoacylés

Les ARNt aminoacylés sont des molécules possédant une très grande réactivité au niveau de la liaison ester reliant l'acide aminé à l'ARNt. Bien que les aaRS soient spécifiques de la position 2' ou 3' du ribose de l'adénosine terminale, une réaction non enzymatique appelée transacylation a lieu de manière spontanée à une vitesse d'environ 5 s^{-1} en solution aqueuse à pH physiologique. Cette transacylation génère des isomères 2' ou 3' O-aminoacylés (régioisomères 2' ou 3') et l'équilibre thermodynamique entre ces 2 isomères est d'environ 1/1 (**Figure 26**) (Taiji et al., 1983). La liaison ester peut également s'hydrolyser de manière spontanée à pH physiologique, de par l'attaque d'une molécule d'eau sur la liaison ester reliant l'acide aminé à l'ARNt. Ainsi les ARNt aminoacylés ont une demi-vie pouvant aller de quelques minutes à plusieurs heures (Peacock et al., 2014).

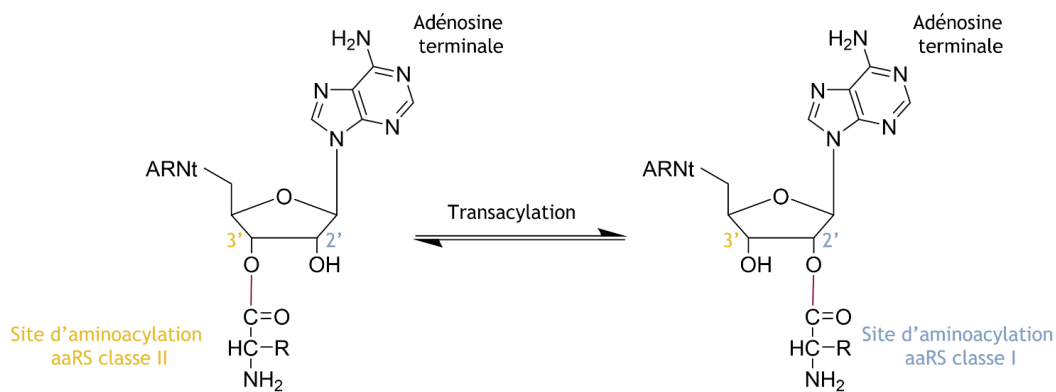


Figure 26 : Réaction de transacylation et site d'aminocyclation des aaRS de classe I ou II.

4.6. Reconnaissance des ARNt aminoacylés par la machinerie de traduction

Une fois aminoacylés, les ARNt sont le plus souvent dirigés vers la voie de synthèse protéique. Ils sont reconnus par le facteur d'élongation EF-Tu complexé avec du GTP (EF-Tu:GTP) qui les transporte jusqu'au ribosome où ils se lient dans le site A (site accepteur). L'appariement des bases codon-anticodon déclenche l'hydrolyse du GTP par EF-Tu et sa libération. Après la formation de la liaison peptidique entre le peptide en cours de synthèse et le nouvel acide aminé à incorporer dans la protéine, l'ARNt passe du site A aux sites P (site peptidique) puis E (site exit) et se dissocie du ribosome (**Figure 27**) (Suzuki, 2021). Contrairement à FemX de *W. viridescens* qui est spécifique du régioisomère 2' de son substrat ARNt, il a été démontré que les sites A et P du ribosome sont spécifiques des régioisomères 3' (Huang et al., 2006).

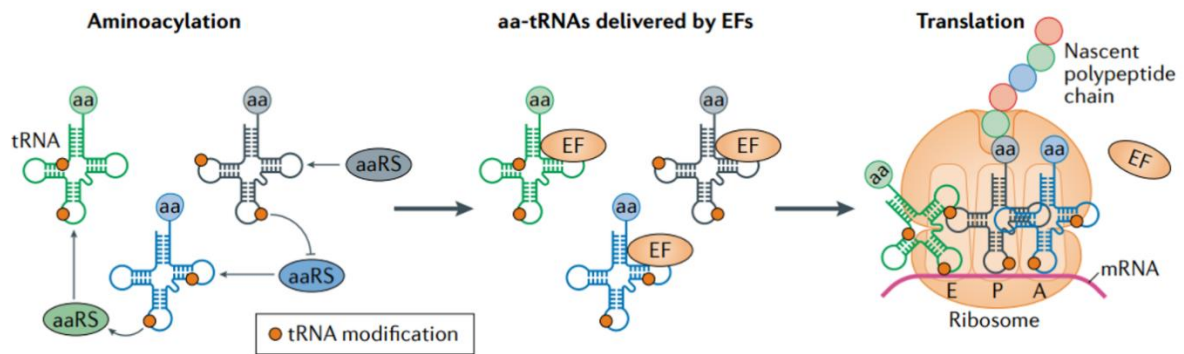


Figure 27 : Rôle des ARNt dans la synthèse protéique.

Les ARNt qui portent des éléments d'identités assurant une acylation correcte et empêchant la mésacylation, sont pris en charge par EF-Tu puis transportés jusqu'au ribosome où ils participent à la synthèse protéique. Issue de (Suzuki, 2021)

Facteur d'élongation EF-Tu et ribosome

EF-Tu interagit majoritairement avec deux régions de l'ARNt qui sont la tige-boucle T et l'acide aminé estérifié. Le mécanisme de reconnaissance des aa-ARNt est conservé chez toutes les bactéries et il a été montré qu'il existe un effet compensatoire entre l'affinité de EF-Tu pour la tige-boucle T de l'ARNt et son affinité pour l'acide aminé estérifié porté par cet ARNt. Un acide aminé moins bien reconnu par EF-Tu sera porté par un ARNt possédant une séquence dans la tige T permettant de compenser cette faible affinité et de stabiliser le complexe aa-ARNt:EF-Tu. Cet effet compensatoire permet à tous les aa-ARNt d'être reconnus avec la même affinité par EF-Tu afin d'être transporté vers le ribosome avec la même efficacité (LaRiviere et al., 2001; Uhlenbeck and Schrader, 2018). Certains éléments, comme les paires de bases $G^{49}-U^{65}$ et $G^{51}-C^{63}$, ont été identifiés comme étant des éléments permettant une forte interaction avec EF-Tu (Sanderson and Uhlenbeck, 2007).

Chez *S. aureus* une étude de séquence a permis de mettre en évidence des éléments permettant aux Gly-ARNt^{Gly} non protéogéniques d'échapper à la reconnaissance par EF-Tu afin d'être préférentiellement dirigés vers la voie de synthèse du PG. En effet, les bases $G^{49}-U^{65}$, $C^{50}-G^{64}$ ou $U^{50}-A^{64}$ et $G^{51}-C^{63}$ présentes chez les ARNt P sont remplacées par $A^{49}-U^{65}$, $U^{50}-A^{64}$ et $A^{51}-U^{63}$ chez les ARNt NP et ces modifications de séquences ont été corrélées avec un plus faible taux d'interaction avec EF-Tu (**Figure 28**) (Giannouli et al., 2009).

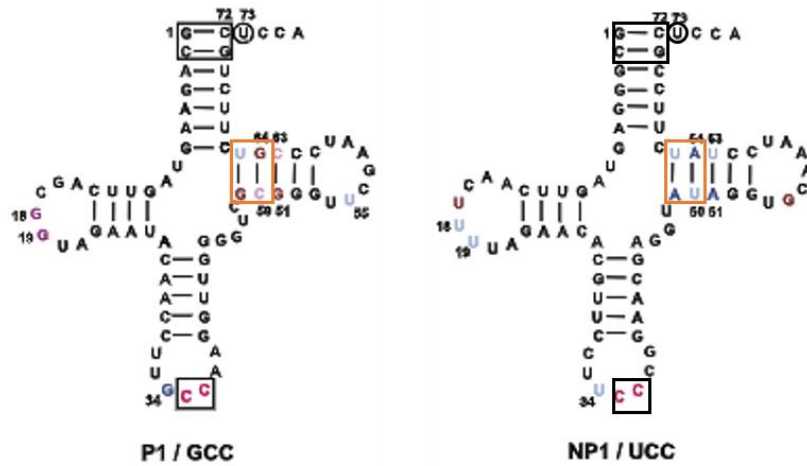


Figure 28 : Éléments d'identités permettant l'interaction avec la GlyRS et EF-Tu.

Les éléments reconnus par la GlyRS sont encadrés en noir et sont identiques chez les isoaccepteurs P et NP. Les paires de bases G⁴⁹-U⁶⁵ et G⁵¹-C⁶³ permettant une forte interaction avec EF-Tu sont présentes chez les isoaccepteurs P et remplacés par A⁴⁹-U⁶⁵ et A⁵¹-U⁶³ chez les NP, elles sont encadrées en orange. Adaptée de (Giannouli et al., 2009).

5. Objectifs de la thèse

S. aureus est un des premiers agents responsables d'infections nosocomiales et communautaires. L'apparition et la diffusion de souches multirésistantes aux antibiotiques, et notamment à la méticilline (SARM), a entraîné une difficulté pour le traitement des infections. L'OMS a ainsi défini *S. aureus* comme un pathogène prioritaire pour le développement de nouveaux antibiotiques. L'équipe de recherche dans laquelle j'ai effectué ma thèse, étudie les mécanismes de résistance aux antibiotiques et identifie de nouvelles cibles thérapeutiques pour le développement de nouvelles molécules antibactériennes afin d'améliorer la prise en charge et le traitement de patients. Elle s'intéresse tout particulièrement aux enzymes impliquées dans la synthèse du PG, composant de la paroi bactérienne. C'est dans ce contexte, que j'ai été amenée à étudier les transférases de la famille Fem de *S. aureus*, enzymes essentielles à la viabilité de la bactérie.

S. aureus possède trois principales transférases de la famille Fem (FmhB, FemA et FemB) qui catalysent le transfert d'une glycine d'un Gly-ARNt^{Gly} sur les précurseurs sous forme de lipide II du PG afin de synthétiser une chaîne latérale pentaglycine. FmhB ajoute la première glycine, tandis que FemA et FemB ajoutent respectivement les glycinés en position 2 et 3, et 4 et 5. Durant ma thèse j'ai étudié et caractérisé les modes d'interaction de FmhB, FemA et FemB avec leurs différents substrats : les Gly-ARNt^{Gly} et leurs intermédiaires lipidiques respectifs.

Chez *S. aureus* les Gly-ARNt^{Gly} sont utilisés de manière compétitive dans deux voies métaboliques distinctes : la synthèse protéique et la synthèse pariétale. Mon premier axe de recherche a été d'évaluer la spécificité de substrat des transférases Fem pour les différents isoaccepteurs d'ARNt^{Gly} et d'identifier les déterminants impliqués dans l'interaction des Fem avec les Gly-ARNt^{Gly}.

Mon second axe de recherche a porté sur l'interaction des transférases Fem avec leur second substrat, le lipide II. Ainsi, l'hémi-synthèse d'analogues solubles de lipides II (substrats et inhibiteurs) m'a permis de caractériser ces interactions, de comprendre la spécificité de substrat étroite de chaque transférase et de déterminer les activités des enzymes pour leurs substrats respectifs. Dans ce contexte, l'impact de l'amidation des intermédiaires lipidiques sur FmhB, FemA et FemB a également été étudié.

Afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes de reconnaissance et des mécanismes enzymatiques, j'ai également procédé à des expériences de cristallographie aux rayons X pour obtenir des structures des enzymes sous forme d'apoenzyme ou en complexe avec des analogues de lipides ou des molécules BS. Ces informations structurales m'ont permis de développer des molécules inhibant les transférases Fem.

Pour finir, un projet de recherche mené sur la transférase FemX de *W. viridescens*, m'a permis d'explorer le potentiel des acides xéno-nucléiques comme substrats et inhibiteurs des transférases de la famille Fem.

MATERIELS ET METHODES

Dans cette section, seuls les matériels et méthodes essentiels à la compréhension des chapitres II et III seront abordés. Le reste du matériel et méthodes se situent dans les articles publiés ou en cours de révision chez *Nucleic Acids Research* constituant les chapitres I et IV de ce travail.

1. Surexpression et purification des protéines à His-Tag

1.1. FmhB, FmhB C^{70S}, FmhB C^{70S} L^{206T}, FemA et FemB de *S. aureus*.

Les protéines contenant une étiquette hexa-histidine C-terminale ont été produites et purifiées comme décrit précédemment (Rietmeyer et al., 2021) avec des modifications mineures. Brièvement, les protéines ont été surexprimées et produites chez *E. coli* BL21 (DE3) et purifiées par chromatographie d'affinité métallique (Ni-Sepharose 6 Fast flow, General Electrics) dans un tampon HEPES (50 mM ; pH 7,5) complémenté par du NaCl (1M), du MgCl₂ (5mM), du β-mercaptoéthanol (2 mM), et un cocktail d'inhibiteurs de protéase ne contenant pas d'EDTA (SigmaFast, Sigma Aldrich) (Tampon A). Après avoir été mis en contact avec l'extrait brut clarifié, la résine a été lavée successivement avec le tampon A (50mL), un tampon complémenté par de l'imidazole (10mM) et dépourvu d'inhibiteurs de protéases (50mL ; 10mM). Les protéines ont été éluées avec un tampon HEPES complémenté par une forte concentration d'imidazole (250 mM) suivi d'une purification par exclusion de taille sur une colonne Superdex 75 HR 26/60 (General Electrics) préalablement équilibrée en tampon phosphate de potassium (100mM, pH 7.5) complémenté par du KCl (500 mM). Les protéines ont été concentrées par ultra-filtration (Amicon Ultra, seuil de 30 kDa ; Millipore). Après ajout de glycérol (50 % ; v/v), les protéines ont été dosées par la méthode au bleu de Bradford et/ou par UV à 280 nm et stockées à -20°C. La pureté des protéines a été vérifiée par SDS-PAGE.

Deux étapes de purification supplémentaires ont été nécessaires pour réaliser les expériences de cristallogénèse des protéines FmhB C^{70S} et FmhB C^{70S} L^{206T}. Après la première étape de purification sur SuperDex 75, la protéine concentrée a été diluée cinq fois dans un tampon éthanolamine (50 mM ; pH 10) complémenté par du DTT (1mM) et du glycérol (10%). La protéine a été purifiée par chromatographie ionique) à l'aide d'une colonne de type di-éthyl-amminoéthyle (Resource Q, 6 mL, General Electrics) préalablement équilibrée avec le même tampon. La protéine a été éluée avec un gradient de NaCl (de 0 à 1M). Les protéines ont été concentrées par ultra-filtration (Amicon Ultra ; 30 kDa cutoff ; Millipore) et conservées dans le tampon de purification à -20°C jusqu'à leur utilisation. Pour chaque expérience cristallographique, la protéine a été purifiée extemporanément par chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex 200 10/300 GL (General Electrics) équilibrée en tampon HEPES (50mM ; pH 7.5) contenant du NaCl (300mM), du DTT (1mM), du MgCl₂

(5mM), et du glycérol (10%). La protéine a finalement été concentrée à 10 mg.mL⁻¹ et conservée sur glace jusqu'aux expériences cristallographiques.

1.2. Extrait cellulaire contenant MurT/GatD de *Streptococcus pneumoniae*

Le plasmide pET-30ΩMurT/GatD contenant le gène codant pour le complexe MurT/GatD de *Streptococcus pneumoniae* nous a été gracieusement fourni par E. J. Breukink (Morlot et al., 2018). Les cellules de *E. coli* BL21 (DE3) transformés contenant le pET-30ΩMurTGatD ont été cultivés dans 2L de milieu BHI complété par 50 µg.mL⁻¹ de kanamycine à 37°C. Lorsque l'absorbance à 600 nm atteint 0,6 l'induction de la production de la protéine a été réalisée par l'ajout d'IPTG (500 µM) et la culture a été incubée pendant 2h à 37°C. Les cellules ont été récoltées par centrifugation (4 000 rpm ; 30 min ; 4°C) et les bactéries ont été mises en suspension dans un tampon de lyse (Tris-HCl 100 mM ; pH 8,0) complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéase sans EDTA (SigmaFast ; Sigma-Aldrich). Les cellules ont été lysées, centrifugées, et le surnageant a été concentré par ultrafiltration puis aliquoté et conservé à -60°C. L'extrait cellulaire contenant le complexe MurT/GatD a été utilisé pour l'amidation des lipides sans purification supplémentaire.

2. Synthèse *in vitro* d'analogues solubles du lipide II

2.1. Extraction et purification du précurseur de l'UDP-MurNAc-pentapeptide (UM5K) à partir d'un extrait bactérien

La souche de *S. aureus* RN4220 isolée a été cultivée dans du milieu BHI (2L) sous agitation à 37°C. A DO_{600nm} = 0,9 de la vancomycine a été ajoutée (25 mg.mL⁻¹) et la culture a été incubée pendant deux heures supplémentaires sous agitation à 37°C. Les bactéries ont été récoltées par centrifugation (10 min ; 4 000 rpm ; 4°C), lavées avec de l'eau (50 mL) puis transvasées dans de l'eau bouillante (350 mL) dans un ballon et maintenues à 95°C pendant 30 min sous forte agitation. Le mélange a été ensuite incubé 30 min sur la glace avant l'ajout à la solution d'acide trichloracétique (TCA) a été ajouté (5%). Le mélange a été maintenu sur glace et sous agitation pendant 30 min. Après centrifugation (4 000 rpm ; 30 min ; 4°C), le surnageant contenant l'UM5K a été extrait trois fois par de l'éther diéthylique (50 mL) pour éliminer le TCA. La phase aqueuse a été concentrée par évaporation sous pression réduite jusqu'à un volume final d'environ 15 mL. La solution contenant l'UM5K a été ensuite dessalée sur une colonne G25 (30 x 5 cm) équilibrée préalablement en eau. Les fractions contenant le produit ont été identifiées par spectroscopie de masse, lyophilisées et purifiées par *rp*HPLC sur une colonne préparative C18 (5 µm ; 22 x 250 mm ; Nucleosil, Macherey-Nagel) équilibrée avec un tampon de formiate d'ammonium (50 mM, pH 5.0) à un débit de 10 ml.min⁻¹. Un gradient linéaire d'acétonitrile a été appliqué de 0 à 20 % entre 10 et 40 minutes. Les fractions contenant le produit ont été identifiées

par spectrométrie de masse, lyophilisées et dissoutes dans l'eau. L'UM5K a été quantifié par absorption UV à 260 nm ($\epsilon_{260\text{nm}} = 10\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Le rendement obtenu a été de 70 μmoles (81 mg) pour deux litres de culture.

2.2. Synthèse de l'UM5K possédant 1 à 5 glycines au niveau de la chaîne latérale

L'insertion d'une chaîne latérale contenant 1 à 5 résidus glycine a été réalisée en utilisant la stratégie Fmoc classique de synthèse sur support solide. Un acide aminé *N*-protégé (Fmoc-Gly, Bachem) ou un peptide (Fmoc-(Gly)_n, Bachem) (0,25 mmol) et du *N*-hydrosuccinimide (1,2 équivalent, 0,3 mmol) ont été dissous dans de la *N,N'*-diméthylformamide (1 mL ; DMF) sous agitation, sous azote et sur glace. La *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC ; 1 équivalent, 0,25mmol ; Sigma-Aldrich) a été dissous dans un mélange 1/1 de DMF et de 1,4-dioxane (2 mL) et ajouté lentement à 0°C à la solution d'acide aminé. Après l'addition, la réaction a été incubée à température ambiante pendant 4h. 300 μL de la solution ont été centrifugés (1min ; 16,400 rpm) et le surnageant a été ajouté à 300 μL d'une solution contenant l'UM5K (2 μmoles) dilué dans un tampon de carbonate de sodium (pH 9.0 ; 500 mM). Après 30 min d'incubation à 37°C, de la pipéridine a été ajoutée au mélange réactionnel (20% final ; Carlo Erba) et la réaction a été incubée pendant 30 min à 37°C. Après addition d'eau (5mL), le mélange a été extrait avec du chloroforme (3x5mL ; Sigma-Aldrich) pour éliminer l'adduit pipéridine-Fmoc formé durant l'étape de déprotection et lyophilisé. Le produit brut lyophilisé a été dissous dans une solution de TFA à 0,1% (3mL) et purifié par *rp*HPLC avec une colonne C18 préparative préalablement équilibrée avec une solution de TFA 0,1% (5 μm ; 22 x 250 mm ; Nucleosil, Macherey-Nagel) à un débit de 10 ml.min⁻¹. Un gradient linéaire d'acétonitrile a été appliqué de 0 à 20 % entre 12 et 56 min. Les fractions contenant l'UM5K modifié ont été identifiées par spectroscopie de masse, lyophilisées, dissoutes dans l'eau et quantifiées par absorption UV à 260 nm ($\epsilon_{260\text{nm}} = 10\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Pour la synthèse des chaînes latérales tétra ou penta-glycine, une seconde réaction de couplage avec Fmoc-(Gly)₁ ou Fmoc-(Gly)₂ a été réalisée sur UM5K-(Gly)₃ préalablement purifié. La pureté des UM5K contenant de 1 à 5 glycines (UM5K-(Gly)_n ; n=1 à 5) a été vérifié par *rp*HPLC analytique et par MS.

2.3. Synthèse des UM5K possédant un groupement glycol ou malonate en position terminale de la chaîne latérale

Les UM5K fonctionnalisés à (Gly)_n avec n allant de 0 à 4 possédant un groupement glycol ou malonate en position terminale de leur chaîne latérale ont été obtenus en appliquant le même protocole que ci-dessus avec une modification mineure. Le groupement glycol (Sigma-Aldrich) ou malonate (Sigma-Aldrich) n'étant pas protégé par un groupement Fmoc l'étape d'ajout de la pipéridine, et d'incubation 30min à 37°C a été supprimée.

2.4. Synthèse *in vitro* des lipide II à C₁₀ par un système enzymatique couplé MraY/MurG

Les analogues solubles des lipide II contenant un groupement di-prényle (néryle) ont été obtenu *in vitro* par des réactions enzymatiques couplées contenant les enzymes MraY de *Aquifex aeolicus*, MurG de *E. coli*, de l'UM5K-(Gly)_n, et du néryl-phosphate commercial (Sigma Aldrich). Les mélanges réactionnels ont été incubés pendant 18 h à 37°C dans une solution contenant du tampon Tris-HCl (50 mM ; pH 8,0), du néryl-phosphate (Z,w) sous forme de sel de lithium (15 mM ; Sigma Aldrich), de l'UM5K-(Gly)_n (n=0 à 5 ; 12.5 mM), de l'UDP-GlcNAc (15 mM ; Sigma-Aldrich), du MgCl₂ (10 mM), du NaCl (50 mM), du Tween20 (5 mM), du DMSO (2% v/v), l'enzyme MraY (1 mg.ml⁻¹), et l'enzyme MurG (1 mg.ml⁻¹). De façon à inhiber toute activité D,D-carboxypeptidase contaminante qui aurait pu être présente dans les préparations MraY ou MurG, nous avons ajouté deux antibiotiques inactivant ces enzymes, la céfoxitine (40 µg.ml⁻¹) et le méropénème (40 µg.ml⁻¹). Après incubation, 70 µL de tampon A (formiate d'ammonium 10 mM pH 5,0) pour 30 µL de l'échantillon ont été ajoutés sur le mélange réactionnel. Le mélange a été centrifugé (12 000 x g pendant 10 min à température ambiante), et le lipide II a été purifié par *rpHPLC* (EC 250 x 4.6 mm Nucleosil 100-5 C8 ; Macherey Nagel) en appliquant un gradient linéaire (0 à 100%) de tampon B (10mM formiate d'ammonium ; pH 5.0 ; 50% acétonitrile) entre 10 et 40 min à un débit de 1 ml.min⁻¹. Les analogues du lipide II ont été détectés par absorbance à 214 nm et analysés par spectrométrie de masse. Après lyophilisation et dissolution dans un volume d'eau minimal, les concentrations des analogues de lipide II (Lipide-II-C₁₀-(Gly)_n avec n=0 à 5 ; ou lipide-II-C₁₀-(Gly)_n-malonate ou lipide-II-C₁₀-(Gly)_n-glycol avec n=0 à 4) ont été déterminées par hydrolyse des acides aminés suivie d'injections dans un analyseur d'acides aminés de type Hitachi L8800 équipé d'une colonne 2620 MSC-PS (dosages effectués dans l'équipe du Dr T. Touzé, I2BC, Paris-Saclay). La pureté des analogues de Lipide II a été évaluée par injection de 5 nmol de chaque composé sur une colonne C8 analytique (EC 250 x 4.6 mm Nucleosil 100-5 C8 ; Macherey Nagel).

2.5. Synthèse *in vitro* des intermédiaires amidés du lipide II

Le lipide II-C₁₀, le lipide II-C₁₀-(Gly)₁, le lipide II-C₁₀-(Gly)₃, et le lipide II-C₁₀-(Gly)₅ ont été amidés *in vitro* grâce à un extrait cellulaire contenant le complexe MurT/GatD de *Streptococcus pneumoniae* (Morlot et al., 2018). Chaque lipide (entre 250 et 1000 nmoles) a été lyophilisé et dissous dans du tampon HEPES (50 mM ; pH 7,5) contenant du MgCl₂ (10mM), de l'ATP (5mM), de la L-glutamine (10 mM), du NaCl (150 mM), du TCEP (2 mM), et de l'extrait cellulaire (0,54 X soit 0,54 fois le volume final de réaction). Après incubation à 30°C sur la nuit. Le lipide II amidé a été purifié par *rpHPLC* (EC 250 x 4.6 mm ; Nucleosil 100-5 C8 ; Macherey Nagel) en utilisant un gradient linéaire (0 à 100%) de tampon B (10mM formate d'ammonium pH=5.0 ; 50% acétonitrile) appliqué entre 10 et 40 min à un débit de

1 ml.min⁻¹. Les analogues de lipides II amidés ont été détectés à 214 nm et analysés par spectrométrie de masse (LCQ Deca XP-Max ; Thermofisher). La pureté des analogues amidés du lipide II a été évaluée par analyse *rp*HPLC et les concentrations ont été déterminées par hydrolyse des acides aminés suivie d'une injection dans un analyseur d'acides aminés Hitachi L8800 équipé d'une colonne 2620 MSC-PS (dosages effectués dans l'équipe du Dr T. Touzé, I2BC, Paris Saclay). La pureté des analogues amidés de Lipide II a été évaluée par injection de 5 nmol sur une colonne C8 analytique (EC 250 x 4. 6 mm Nucleosil 100-5 C8 ; Macherey Nagel).

3. Synthèse de molécule bi-substrat pour FmhB

3.1. Partie ARN

Les parties ARN des BS 1, BS 2 et BS 3 et l'ARN comportant des HNA ont été synthétisés par synthèse sur support solide (SSS) comme décrit précédemment (Fonvielle et al., 2013b), respectivement par les équipes du Pr. Tom Brown (BS 1, BS 2 et BS 3 ; Université d'Oxford) et du Pr. Piet Herdewijn (HNA ; Université catholique de Louvain). Le précurseur DMT-adenosine-2'azido-phosphoramidite, permettant l'insertion du groupement azido (N₃) en position 2' de l'ARN a été synthétisé par l'équipe du Pr. Mélanie Ethève-Quellejeu comme décrit précédemment (Fonvielle et al., 2013a).

3.2. Synthèse de l'UM5K et du lipide II C₁₀ à thio-alcyne

L'UM5K à thio-alcyne a été synthétisé comme décrit précédemment en collaboration avec l'équipe du Dr. Thierry Touzé (I2BC, Paris-Saclay) (Fonvielle et al., 2013b). La méthode est basée sur la réduction du pont disulfure du résidu méso-cystine par du tris (2- carboxyéthyl)phosphine (TCEP) couplée à une réaction d'addition élimination en présence de 2,5-dibromohexanediamide aboutissant à la formation d'un résidu dehydroalanine. Le mélange réactionnel contenait l'UM5K à méso-cystine (5 mM), du TCEP (20 mM), du tris-(2,5- dibromohexanediamide) (100 mM), du phosphate de potassium (100 mM, pH 8,0), et 20% final de DMF. La solution de tris-(2,5-dibromohexanediamide) dans la DMF à 100 mM a été préparée extemporanément à chaque fois. La réaction a été suivie par masse jusqu'à disparition complète de l'UM5K-mesocystine et de l'UM5K cystéine (temps classique d'incubation de 1h30 h à 37°C). L'UM5K à dehydroalanine (UM5K-dha) a été purifié par chromatographie d'exclusion de taille (SuperDexpeptide 10/300 GL, General Electrics) équilibrée en eau (260nm, 1mL.min⁻¹). Les fractions contenant le produit de réaction ont été lyophilisées. L'UM5K-dha a ensuite été fonctionnalisé pour former l'UM5K à thio-alcyne. Pour cela, du 3-butyne-1-thiol (50mM) a été ajouté à l'UM5K-dha (0,5 mM) dans un tampon DMF-phosphate (100mM ; pH = 8.0) (1/19 v/v) et la réaction a été incubée pendant 2h30 à 37°C. Le diastereoisomère (DiaB) correspondant à l'analogue de

configuration L de la Lys³ de l'UM5K a été purifié par *rpHPLC* (EC 250/4.6 Nucleosil 100-5 C18 ; Macherey Nagel) avec un gradient linéaire d'acétonitrile (0 à 5%) dans un tampon acétate d'ammonium (50 mM ; pH 5,0) appliqué entre 10 et 40 min à un débit de 1 mL.min⁻¹. Les fractions contenant les deux diastereoisomères (DiaA et DiaB) ont été lyophilisées et dissout dans de l'eau dépourvue de RNase (Sigma-Aldrich). La pureté des deux diastéréoisomères a été évaluée par spectrométrie de masse et par *rpHPLC* analytique avec un gradient linéaire d'acétonitrile (0 à 15 %) dans de l'acétate d'ammonium (50 mM ; pH 5,0) appliqué entre 10 et 40 min (260 nm, 1 mL.min⁻¹). Les concentrations ont été déterminées par spectrophotométrie ($\epsilon_{260\text{nm}} = 10\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Les lipides II-C₁₀ à thio-alcyne ont été synthétisés et purifiés comme décrit dans la section **2.3** de la partie matériels et méthodes en utilisant le diastéreoisimère B (DiaB) identifié comme l'analogue structurel de la L-Lys³ de l'UM5K (Fonvielle et al., 2018, 2013b).

3.3. Synthèse du BS

La réaction de cycloaddition de Huisgen-Sharpless a été réalisée dans un volume de 20 μL contenant les analogues de lipides II-C₁₀ à thio-alcyne (2,5 mM), l'ARN azido (2,5 mM), du tris(3-hydroxypropyltriazolylméthyl)amine (THPTA) (3,5 mM), du sulfate de cuivre (0,5 mM), de l'ascorbate de sodium (10 mM) et du tampon phosphate de sodium (100 mM ; pH 8,0). Les analogues du lipide II et l'ARN-azido ont été lyophilisés ensemble avant l'ajout des autres composants de façon à minimiser le volume réactionnel et augmenter la concentration des deux partenaires. L'incubation a été effectuée dans un thermocycleur PCR à 37°C pendant 2 h. Les peptidyl-ARN ont été purifiés par chromatographie d'échange d'anions (DNAPAc PA100 ; Dionex) en utilisant un gradient linéaire (de 25 mM à 2,5 M) d'acétate d'ammonium (pH 8,0) contenant 0,5 % d'acétonitrile (*v/v*), qui a été appliqué entre 8,5 et 33,5 min. Les adduits peptidyl-ARN obtenus ont été lyophilisés deux fois et dissous dans de l'eau dépourvue de RNase (Sigma-Aldrich). La concentration des adduits peptidyl-ARN a été déterminée par spectrophotométrie ($\epsilon_{260\ \text{nm}} = 180\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). La pureté des adduits peptidyl-ARN a été évaluée par LC-MS et par injection sur DNAPAc analytique.

4. Test cinétiques

4.1. Détermination des TO de FmhB, FemA et FemB de *S. aureus*.

LC-MS

Pour chaque enzyme la réaction enzymatique a été réalisée dans 18 μL de tampon Tris-HCl (50mM ; pH 7.5) contenant de l'ATP (7.5mM), du MgCl₂ (12. 5mM), du DTT (2mM), de la glycine (300 μM), et l'ARNt^{Gly} (NP2, 0.5 μM), et le substrat lipidique de l'enzyme (60 μM). La réaction a été initiée par l'ajout de l'enzyme FmhB (0.005 μM), ou FemA (respectivement 0.1 μM ou 0.2 μM pour sa première

ou seconde réaction), ou FemB (respectivement 0.025 μM ou 0.2 μM pour sa première ou seconde réaction) puis incubée à 30°C. A des temps donnés, des aliquots de 3 μL de la réaction ont été instantanément congelés à -60°. Chaque aliquot a été décongelé juste avant d'être injecté sur une colonne C18 (50x2mm Nucleoshell RP 18 2.7 μm ; Macherey-nagel) couplée au spectromètre de masse. La colonne a été préalablement équilibrée avec de l'acide formique à 0,1%. Les analogues de lipide-II- C_{10} ont été élués à 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ avec un gradient rapide de tampon B (ACN/0,1% d'acide formique) appliqué entre 2 et 15 min. Une étape de lavage (100% ACN) entre 15 et 17 min et une étape de rééquilibrage (100% A) entre 17 et 12 min et une injection à blanc ont été réalisés afin de rééquilibrer le système avant l'injection de l'aliquot suivant. Le pic contenant l'ensemble des analogues du lipide II a été intégré et pour chaque composé, l'intensité des pics $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a été mesurée. Les concentrations de produits ont été calculées en déterminant le rapport entre la somme de l'intensité de chacun des deux pics et l'intensité totale des pics. Les concentrations d'enzymes de FemA et FemB utilisées pour les tests ont été déterminées après plusieurs essais afin que la première réaction enzymatique soit très largement majoritaire par rapport à la seconde (second produit de réaction non visible en masse). La concentration de produit de réaction formé au cours du temps a été représenté sur un graphique puis la valeur de la vitesse (v) de formation du produit a été obtenue en ajustant une équation linéaire aux données obtenues. Le « turn over » (TO) a été déterminée en divisant la vitesse de réaction par la concentration en enzyme (v/[enzyme]). Afin de vérifier que les concentrations des produits formés peuvent bien être calculées à partir de l'intensité des pics MS, les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec de la glycine radiomarquée au carbone 14.

Radioactivité

Les cinétiques ont été réalisées en parallèle avec de la glycine radiomarquée au carbone 14. La réaction a été initiée par l'ajout de l'enzyme FmhB (0.005 μM), ou FemA (respectivement 0.1 μM ou 0.2 μM pour sa première ou seconde réaction), ou FemB (respectivement 0.025 μM ou 0.2 μM pour sa première ou seconde réaction) puis incubée à 30°C. Au même temps que pour les cinétiques avec de la glycine non radiomarquée, 3 μL de la réaction ont été déposés sur une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) en cellulose pré-enduite (ALUGRAM CEL 300 ; Macherey-Nagel ; 10 cm de haut). La ^{14}C -Gly et le produit de réaction ont été séparés par CCM en utilisant comme phase mobile un mélange 5/3 (v/v) d'acide isobutyrique et d'ammoniaque 1M. Les taches radioactives correspondant à la glycine n'ayant pas réagi et aux lipides ayant incorporés de la glycine ont été identifiées par autoradiographie, coupées et quantifiées par comptage par scintillation liquide. Les TO ont été déterminés en divisant les vitesses de réaction par la concentration en enzyme (v/[enzyme]).

4.2. Détermination de l'activité *in vitro* de FmhB, FemA et FemB dans un essai enzymatique couplé

Pour étudier la synthèse de la chaîne latérale pentaglycine du lipide II par les transférases Fem nous avons développé des essais enzymatiques couplés contenant FmhB, FemA, et FemB. Ces expériences nous permettent de suivre les apparitions successives de tous les produits intermédiaires au cours du temps par LC-MS et de déterminer la constante catalytique pour chaque réaction en utilisant un programme de modélisation mathématique de cinétiques enzymatiques (COPASI). Les réactions couplées ont été réalisées dans 100 μL de tampon Tris-HCl (50mM ; pH 7.5) contenant de l'ATP (7.5mM), du MgCl_2 (12.5mM), du DTT (2mM), de la glycine (300 μM), l'ARNt^{Gly} (NP2, 1.5 μM), du lipide-II-C₁₀ (60 μM), de la GlyRS de *S. aureus* (0.8 μM), FmhB (0.01 μM), FemA (0.2 μM), et FemB (0.6 μM). Les concentrations de Fem ont été adaptées de façon à suivre l'apparition de l'ensemble des intermédiaires lipidiques pendant le temps de l'expérience. La concentration d'ARNt^{Gly} a été choisie à 1.5 μM afin de maintenir une concentration saturante du substrat Gly-ARNt^{Gly} pour chaque transférase Fem même et cela même si les trois sites catalytiques des trois enzymes sont entièrement occupés (Rietmeyer et al., 2021). Les réactions enzymatiques couplées ont été initiées par l'ajout simultané de FmhB, FemA et FemB et incubées à 30°C directement dans le passeur d'échantillons de la LC-MS (Surveyor autosampler). La variation des concentrations des différents lipides II au cours du temps a été suivie en injectant 5 μl du mélange réactionnel toutes les 20 min sur une colonne C18 (50x2mm Nucleoshell RP 18 2.7 μm ; Macherey-nagel) couplée au spectromètre de masse. La colonne a été équilibrée avec de l'acide formique à 0,1%. Les analogues de lipide-II-C₁₀ ont été élués à 300 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ avec un gradient rapide de tampon B (ACN/0,1% d'acide formique) appliqué entre 2 et 15 min. Une étape de lavage (100% ACN) entre 15 et 17 min et une étape de rééquilibrage (100% A) entre 17 et 12 min ont été réalisées afin de rééquilibrer le système avant l'injection suivante. Le pic contenant l'ensemble des analogues du lipide II a été intégré et pour chaque composé, l'intensité des pics $[\text{M}+\text{H}]^+$ et $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a été mesurée. Les concentrations de produits ont été calculées en déterminant le rapport entre la somme de l'intensité de chacun des deux pics et l'intensité totale des pics.

Des expériences similaires ont été réalisées dans les mêmes conditions de tampon, exceptée pour la concentration d'ARNt^{Gly} (0.5 μM), avec chaque protéine seule (FmhB 0.01 μM avec 60 μM de lipide-II-C₁₀ comme substrat initial), FemA (0.1 μM avec 60 μM de lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ comme substrat initial), ou FemB (0.1 μM avec 60 μM de lipide-II-C₁₀-(Gly)₃ comme substrat initial). La concentration d'ARNt^{Gly} de 0.5 μM est cette fois-ci suffisante pour maintenir une concentration saturante du substrat Gly-ARNt^{Gly} pour chaque transférase Fem. Pour étudier la coopérativité de FemB et de FemA, un test couplé comprenant FemB et FemA en condition équimolaire (0.1 μM) et le lipide-II-C₁₀-(Gly)₃ (1^{er}

substrat de FemB) a également été réalisé dans les mêmes conditions cinétiques que pour les protéines seules.

Chaque expérience a été réalisée en duplicata ou en triplicata. Les variations de concentration de chaque produit au cours du temps ont été utilisées pour modéliser le système enzymatique couplé avec le programme COPASI, et cela pour chaque expérience. Les expériences décrites ci-dessus (exceptée l'étude de coopérativité) ont également été réalisées avec des substrats analogues de lipides II amidés et leurs protéines correspondantes.

4.3. Détermination de constantes catalytiques par modélisation avec COPASI

Les constantes catalytiques apparentes ($k_{n \text{ app}}$ ou $k'_{n \text{ app}}$) des cinq transferts de résidus glycyle de Gly-ARNt^{Gly} vers des substrats lipides II à C₁₀ ont été calculées à l'aide de COPASI 4.35 (Build 258) (Hoops et al., 2006). Les concentrations en enzymes et en Gly-ARNt^{Gly} ont été définies comme constantes au cours des réactions. La concentration initiale du substrat lipide II a été définie à 60 μM. Chaque loi de réaction a été spécifiée comme étant la suivante :

$$\text{vitesse} = k_{n \text{ app}} \times [\text{lipide II}]_{n-1} \times [\text{enzyme}] \times [\text{Gly-ARNt}^{\text{Gly}}]$$

L'équation a été ajustée aux données expérimentales obtenues en triplicata ou en duplicata. La fonction d'estimation des paramètres de COPASI (programmation évolutive, 8000 générations, valeurs de départ aléatoires et limites inférieure et supérieure de $k_{n \text{ app}}$ définies comme \pm infini) a été utilisée pour obtenir les $k_{n \text{ app}}$. Une simulation de l'apparition des différents produits au cours du temps avec les $k_{n \text{ app}}$ théoriques obtenus a été réalisée pour évaluer la pertinence du modèle par comparaison avec les données expérimentales. Les $k_{n \text{ app}}$ (ainsi que leurs déviations standard) ont été obtenus en calculant la moyenne \pm la standard déviation des $k_{n \text{ app}}$ des duplicata ou triplicata pour chaque même expérience. En effet, les valeurs de déviations standard données par le programme sont trop faibles pour être prises en considération.

4.4. Test d'inhibition des transférases Fem

Afin d'évaluer la capacité d'inhibition de différentes molécules synthétisées durant ma thèse nous avons mis au point un test d'inhibition compétitive des transférases Fem dont le principe est présenté pour FmhB sur la **Figure 39**. Des concentrations croissantes de l'inhibiteur à tester ont été ajoutées dans un mix réactionnel comprenant du tampon Tris à pH = 7,5 (50mM), l'enzyme à inhiber (0,005μM de FmhB, 0,1μM de FemA ou de FemB), 60μM de son substrat initial (lipide-II-C10 pour FmhB, lipide-II-C10-(Gly)₁ pour FemA et lipide-II-C10-(Gly)₃ pour FemB), l'ARNt^{Gly} (NP2; 0,4μM), de la glycine radiomarquée [¹⁴C]-Gly (60μM), de l'ATP (7,5 mM) et la GlyRS (0,8μM) en très large excès pour

assurer un pool d'ARNt aminoacylé constant. Après 40min d'incubation à 30°C, la glycine radiomarquée et le produit final de réaction ont été séparés par chromatographie sur couche mince (CCM), et les taches radioactives ont été détectées par autoradiographie. La concentration de produit final, en présence des différentes concentrations de l'inhibiteur, a été déterminée par comptage de la radioactivité par scintillation liquide. L'activité résiduelle de l'enzyme en fonction de la concentration en inhibiteur a été calculée et le paramètre d'inhibition K_i a été déterminé en appliquant l'équation de Morrison aux données expérimentales.

5. Conditions cristallogénèse de FmhB

Les enzymes FmhB C^{70S} et FmhB C^{70S} L^{206T} ont été produites et purifiées comme décrites dans la section 1.1. Pour chaque expérience de cristallogénèse, la protéine a été purifiée extemporanément par chromatographie d'exclusion de taille et sa concentration ajustée à 10 mg.mL⁻¹. FmhB C^{70S} ou FmhB C^{70S} L^{206T} a été co-cristallisée avec un analogue de lipide-II-C₁₀ ou une molécule bi-substrat (BS 1). A chaque essai de cristallogénèse un gradient de précipitant (PEG 2000MME allant de 17 à 23%) a été réalisé en présence de tampon Tris-HCl (0,1M ; pH=8,5) contenant de la *N*-oxyde-triméthylamine (200mM) et du glycérol (5%).

5.1. Cristallisation avec le lipide

Plusieurs essais de co-cristallisation ont été réalisés dans les conditions expérimentales décrites précédemment. 10µL de la protéine FmhB C^{70S} ou FmhB C^{70S} L^{206T} (10 mg.mL⁻¹) ont été mélangés avec 40 nmoles de lipide-II-C₁₀ préalablement lyophilisées de façon à obtenir un ratio enzyme/ligand de 1 pour 10. Des volumes de 0.1 µL de solution de complexe ont été ajoutés à 0.1µL de tampon pour chaque condition de cristallogénèse grâce à un robot de cristallisation (Mosquito, TPP Labtech). Pour FmhB C^{70S} avec le ligand, un cristal diffractant à une résolution de 2,98 Å a été obtenu. Dans le cas de FmhB C^{70S} L^{206T} avec le ligand, un cristal diffractant à une résolution de 1,75 Å a été obtenu.

5.2. Cristallisation avec les BS 1 et BS 2

Les conditions de cristallogénèse choisies pour le gradient 1D ont été les mêmes que précédemment. 5µL de la protéine FmhB C^{70S} L^{206T} (10mg.mL⁻¹) ont été mélangés à 5 nmoles de BS 1 ou de BS 2 préalablement lyophilisées (ratio enzyme/ligand 1 pour 5). Dans le cas de la co-cristallisation de FmhB C^{70S} L^{206T} avec le BS 1, un cristal diffractant à une résolution de 3,96 Å a été obtenu. Tous les essais de co-cristallisation avec le BS 2 ont échoués (pas de cristaux).

D'autres tentatives de co-cristallisation ont été réalisées avec les ligands suivants le lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ acide malonique, le lipide-II-C₁₀-(Gly)₁-glycol et l'ARNt NP2 synthétisés *in vitro* (ratio enzyme/ligand de 1 pour 10). Aucun cristal n'a été observé lors de ces tentatives.

RESULTATS

CHAPITRE I : Publication 1

Partition des isoaccepteurs ARNt^{Gly} entre les voies de synthèse des protéines et du peptidoglycane chez *S. aureus*.

S. aureus a pour particularité de posséder un PG épais, réticulé par des chaînes latérales pentaglycine synthétisées par les transférases de la famille Fem. Ces enzymes utilisent les Gly-ARNt^{Gly} comme molécules donneuses de glycine. L'estimation de l'abondance relative de la glycine a permis de montrer que 60% de la totalité de la glycine de la bactérie sont retrouvés dans la paroi tandis que 40% servent à la synthèse protéique. Les Gly-ARNt^{Gly} sont donc utilisés de manière compétitive dans deux voies métaboliques de synthèse. Une répartition harmonieuse des Gly-ARNt^{Gly} entre ces deux processus est donc indispensable à la viabilité de la bactérie. L'objectif de ce travail a donc été d'étudier les mécanismes assurant cette répartition harmonieuse.

Le génome de *S. aureus* contient 7 gènes codant pour 5 isoaccepteurs d'ARNt^{Gly}. Une étude biochimique a permis de les classer en deux groupes : les ARNt^{Gly} dits protéogéniques (P) et les ARNt^{Gly} non protéogéniques (NP) et ces recherches ont permis de poser une hypothèse sur la partition des ARNt^{Gly} entre les processus de synthèse pariétale et de synthèse protéique (Giannouli et al., 2009). La première partie de mon travail de thèse a consisté à étudier l'interaction entre les transférases de la famille Fem de *S. aureus* et les différents isoaccepteurs de Gly-ARNt^{Gly} et d'identifier les déterminants régissant ces interactions. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans Nucleic Acids Research (NAR) en 2020 qui constituera ce chapitre.

Résumé de la publication :

La séquence des ARNt est soumise à des contraintes évolutives imposées par leurs multiples interactions avec les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS), le facteur d'élongation de la traduction (EF-Tu : Elongation Factor Thermo Unstable) en complexe avec le GTP (EF-Tu:GTP) et le ribosome, chacun étant essentiel au décodage précis et efficace des ARN messagers. Chez *Staphylococcus aureus*, une contrainte supplémentaire est imposée par la participation des isoaccepteurs ARNt^{Gly} à la synthèse d'une chaîne latérale pentaglycine sur les précurseurs du peptidoglycane, catalysée par les transférases FmhB, FemA et FemB. Une étude précédente a montré que trois des cinq isoaccepteurs ARNt^{Gly} non acylés possèdent une faible affinité pour le complexe EF-Tu:GTP, tandis que les deux derniers une très forte affinité pour ce complexe (Giannouli et al., 2009). Ces résultats ont permis de proposer que ces deux ARNt^{Gly} seraient préférentiellement utilisés par le ribosome et que les 3

isoaccepteurs restant seraient dédiés à la synthèse pariétale. Aucune étude biochimique n'a permis de valider cette hypothèse.

Grâce à la synthèse d'ARNt par transcription *in vitro* et à des analyses cinétiques nous permettant de calculer les activités des enzymes, nous avons montré que FmhB ainsi que FemA et FemB utilisent préférentiellement les ARNt dits NP. Pour identifier les déterminants régissant cette spécificité d'interaction nous avons synthétisé des ARNt chimériques et des hélices mimant les bras accepteurs d'ARNt ainsi que des analogues stables d'aminoacyl-ARNt possédant les mêmes séquences mais agissant comme inhibiteurs. Ces molécules nous ont permis de mettre en évidence que la discrimination des isoaccepteurs implique principalement des déterminants d'identités situés dans les tiges et les boucles D et T des ARNt NP. Enfin, nous avons montré que le complexe EF-Tu:GTP inhibe FmhB en séquestrant les Gly-ARNt^{Gly}, et plus préférentiellement les ARNt P.

Tous ces résultats nous ont permis de mieux comprendre la dynamique d'interaction entre les différents acteurs de la synthèse protéique et pariétale et indiquent que la compétition pour le pool de Gly-ARNt^{Gly} est restreinte à la fois par la reconnaissance limitée des ARNt non protéogéniques par EF-Tu:GTP et par la reconnaissance limitée des ARNt protéogéniques par les transférases de la famille Fem (**Figure 29**).

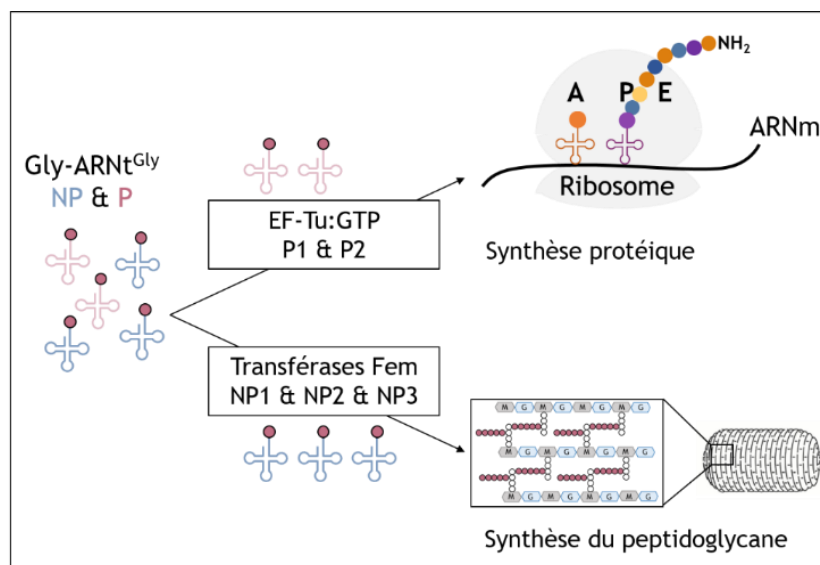


Figure 29 : Partition des Gly-ARNt^{Gly} entre la synthèse protéique et la synthèse de la paroi chez *S. aureus*.

Partition of tRNA^{Gly} isoacceptors between protein and cell-wall peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*

Lauriane Rietmeyer¹, Nicolas Fix-Boulier¹, Chloé Le Fournis¹, Laura Iannazzo²,
Camelia Kitoun², Delphine Patin³, Dominique Mengin-Lecreulx³,
Mélanie Ethève-Quellejeu², Michel Arthur^{1,*} and Matthieu Fonvielle^{1,*}

¹INSERM, Sorbonne Université, Université de Paris, Centre de Recherche des Cordeliers (CRC), F-75006 Paris, France, ²Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, Université de Paris, CNRS UMR 8601, Paris F-75006 France and ³Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198 Gif-sur-Yvette, France

Received April 30, 2020; Revised December 04, 2020; Editorial Decision December 08, 2020; Accepted December 09, 2020

ABSTRACT

The sequence of tRNAs is submitted to evolutionary constraints imposed by their multiple interactions with aminoacyl-tRNA synthetases, translation elongation factor Tu in complex with GTP (EF-Tu•GTP), and the ribosome, each being essential for accurate and effective decoding of messenger RNAs. In *Staphylococcus aureus*, an additional constraint is imposed by the participation of tRNA^{Gly} isoacceptors in the addition of a pentaglycine side chain to cell-wall peptidoglycan precursors by transferases FmhB, FemA and FemB. Three tRNA^{Gly} isoacceptors poorly interacting with EF-Tu•GTP and the ribosome were previously identified. Here, we show that these ‘non-proteogenic’ tRNAs are preferentially recognized by FmhB based on kinetic analyses and on synthesis of stable aminoacyl-tRNA analogues acting as inhibitors. Synthesis of chimeric tRNAs and of helices mimicking the tRNA acceptor arms revealed that this discrimination involves identity determinants exclusively present in the D and T stems and loops of non-proteogenic tRNAs, which belong to an evolutionary lineage only present in the staphylococci. EF-Tu•GTP competitively inhibited FmhB by sequestration of ‘proteogenic’ aminoacyl-tRNAs *in vitro*. Together, these results indicate that competition for the Gly-tRNA^{Gly} pool is restricted by both limited recognition of non-proteogenic tRNAs by EF-Tu•GTP and limited recognition of proteogenic tRNAs by FmhB.

INTRODUCTION

Aminoacyl-tRNAs are used as a source of activated amino acids for non-ribosomal synthesis of various biomolecules, including cell-wall peptidoglycan precursors (Figure 1A) (1), cyclodipeptides (2) and membrane lipids (3). In addition, Phe-tRNA and Leu-tRNA participate in protein aminoacylation, thereby triggering them for protein degradation by the proteasome (4). In *Staphylococcus aureus*, three aminoacyl-transferases of the Fem family (FmhB, FemA and FemB) use five aminoacyl-tRNAs to assemble a pentaglycine side chain onto peptidoglycan precursors (5–7). FmhB adds the first Gly whereas FemA and FemB each adds two residues. FmhB is an essential enzyme indicating that the complete absence of the peptidoglycan side chain is not compatible with synthesis of an osmoprotective peptidoglycan layer and bacterial growth (7). FemA and FemB are dispensable for growth in media of high osmolarity (8) and their absence is not compatible with expression of methicillin resistance mediated by the peptidoglycan transpeptidase PBP2a (9). In fact, the ‘Fem’ designation originates from early investigations based on random transposon mutagenesis that showed that the *femA* and *femB* genes encode factors essential for methicillin resistance (10). The essential role of the Fem transferases for growth or for methicillin resistance indicates that these enzymes are potential targets to develop drugs active on multidrug resistant *S. aureus* (11–13).

The participation of aminoacyl-tRNAs to non-ribosomal synthesis implies that the same aminoacyl-tRNAs are potentially used for protein and peptidoglycan synthesis. Alternatively, the sequence of tRNA^{Gly} isoacceptors may have divergently evolved so that particular aminoacyl-tRNAs are preferentially or exclusively used in

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 144275483; Email: matthieu.fonvielle@crc.jussieu.fr
Correspondence may also be addressed to Michel Arthur. Email: michel.arthur@crc.jussieu.fr

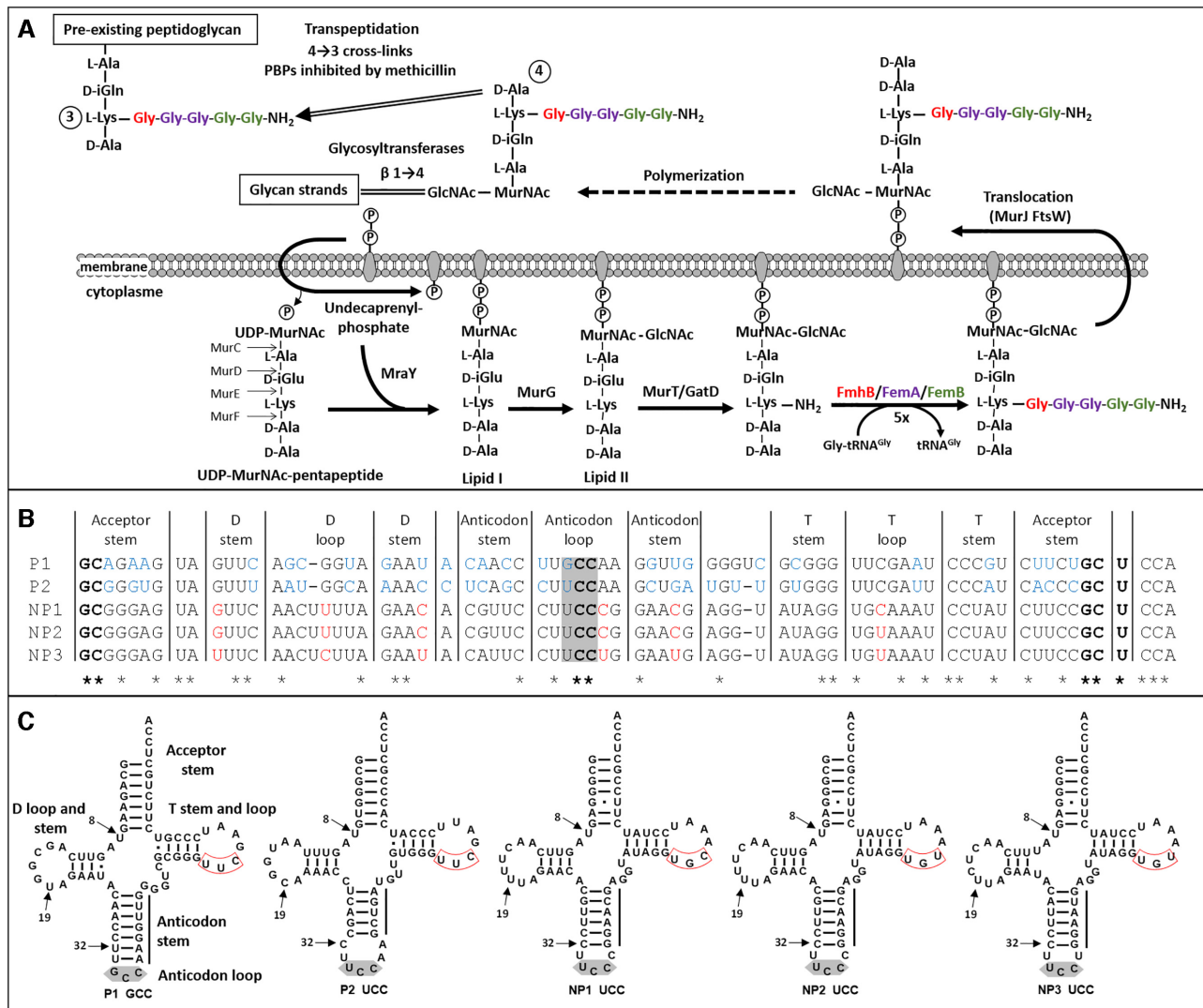


Figure 1. Participation of tRNAs to peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. (A) Peptidoglycan assembly pathway. Aminoacyl-transferases FmhB, FemA and FemB assemble a pentaglycine side chain. The essential role of FmhB (for growth) and of FemA and FemB (for methicillin resistance) stems from the fact that the amino group at the extremity of the pentaglycine side chain is used for peptidoglycan cross-linking in the last step of peptidoglycan polymerization. (B) Alignment of *S. aureus* tRNA^{Gly} isoacceptors. P1 and P2, proteogenic isoacceptors; NP1, NP2 and NP3, non-proteogenic isoacceptors. Stars indicate the position of invariant nucleotides in the five sequences. Bases highlighted in blue and red are divergent within the proteogenic and non-proteogenic tRNA groups, respectively. The anticodon is highlighted in grey. (C) Cloverleaf representation of the five tRNA^{Gly} isoacceptors. Two arrows point to positions 8 and 19 corresponding to potential sites of posttranscriptional modification of non-proteogenic tRNA as discussed in the text (4-thiouridine and 5,6-dihydrouridine, respectively). The remaining arrow points to position 32 that determines the capacity of the unmodified UCC anticodon to decode all four tRNA^{Gly}. The UCC or UGC triplet in the T loop is boxed in red.

either biosynthetic pathway. The chromosome of *S. aureus* harbors seven tRNA^{Gly} genes encoding isoacceptors with five distinct sequences (Figure 1B and C) (14,15). Previous analyses based on affinity chromatography showed that two of them, tRNA^{Gly(GCC-1)} and tRNA^{Gly(UCC-1)}, display high affinity for the binary complex comprising the translation elongation factor Tu and GTP (EF-Tu•GTP) following acylation by the glycyl-tRNA synthetase (GlyRS), as expected for proteogenic aminoacyl-tRNAs (15). These tRNAs were designated P1 (GCC anticodon) and P2 (UCC-1) for proteogenic tRNAs. The remaining acylated isoacceptors (UCC-2, UCC-3 and UCC-4) eluted at low salt concentrations suggesting that they bind

to EF-Tu•GTP with low affinity and could therefore preferentially participate in peptidoglycan synthesis. The tRNA^{Gly(UCC-2)}, tRNA^{Gly(UCC-3)} and tRNA^{Gly(UCC-4)} were thus referred to as non-proteogenic isoacceptors NP1, NP2, and NP3, respectively. Analyses performed in the 60s and 70s on tRNAs purified from cultures of staphylococci resolved highly purified fractions containing non-proteogenic tRNA^{Gly} in *S. aureus* (16) and in closely related *Staphylococcus epidermidis* (17–20). The tRNAs present in these fractions displayed no binding affinity for ribosomes programmed with any of the four triplets specifying Gly and were unable to participate in *in vitro* protein synthesis (16–18). In addition, the non-proteogenic

tRNA purified from *S. epidermidis* did not form a complex with EF-Tu•GTP (21), as also found for homologous tRNAs from *S. aureus* obtained by *in vitro* transcription in a more recent study (15). Two non-proteogenic tRNAs from *S. epidermidis* (tRNA^{Gly} Ia and Ib) were sequenced by biochemical methods (19) and were found to contain an unusually low content in modified bases (19,20), which was limited to one 4-thiouridine residue (position 8) and one 5,6-dihydrouridine residue (position 19) (Figure 1C). The absence of pseudouridine, which is ubiquitous in the T loop, was noteworthy. In agreement, the DNA sequence of the three non-proteogenic tRNA^{Gly} genes contains the TGC or TGT triplet in the T loop instead of the TTC triplet in proteogenic tRNAs (red box, Figure 1C) in which the second nucleotide corresponds to the position of the post-transcriptional modification of uridine to pseudouridine (14,15). The presence of an additional base-pairing in the anticodon stem of P1-GCC (seven instead of six in the three NP-UCCs) and the corresponding reduction in the number of bases in the anticodon loop (three in P1 instead of five in non-proteogenic tRNA^{Gly}) is also worth noting (22). The unusual features of the non-proteogenic tRNA^{Gly} were rationalized in terms of impaired interactions with EF-Tu and the ribosome [see (22) for discussion].

The interaction of the five *S. aureus* tRNA^{Gly} isoacceptors with components of the translation machinery has deserved much attention. In contrast, little is known on the recognition of the isoacceptors by the Fem transferases. There is a consensus for the potential participation of the five tRNA^{Gly} to peptidoglycan synthesis in *S. aureus* and *S. epidermidis* but the analyses were only qualitative (17,18). In this study, we determine whether FmhB preferentially uses specific tRNA^{Gly} isoacceptors for *in vitro* synthesis of peptidoglycan precursors. A positive answer to this first question prompted us to construct chimeric tRNAs in order to identify the tRNA regions that enable FmhB to discriminate between tRNA^{Gly} isoacceptors. Investigation of the mode of tRNA recognition by FmhB was also based on the synthesis of stable Gly-tRNA^{Gly} analogues with various nucleotide sequences that behaved as potent FmhB inhibitors. Since competitive binding of aminoacyl-tRNAs to FmhB and EF-Tu•GTP is expected to be the key factor determining the partition of members of the Gly-tRNA^{Gly} pool between peptidoglycan and protein synthesis, a second assay was developed to compare the relative affinity of these proteins for the aminoacylated tRNA isoacceptors. The observed weak interaction of non-proteogenic Gly-tRNA^{Gly} with EF-Tu•GTP, in combination with phylogenetic analyses of the tRNA^{Gly} sequences from firmicutes, led to the conclusion that staphylococci produce a set of peculiar tRNA^{Gly} paralogues that preferentially participate in peptidoglycan synthesis, thereby preventing the potentially negative impact of a competitive use of the same aminoacyl-tRNAs in protein and peptidoglycan synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of FmhB substrates

In *S. aureus*, FmhB catalyzes the transfer of a glycylyl residue from Gly-tRNA^{Gly} to the undecaprenyl-PP-

MurNAc(-pentapeptide)-GlcNAc peptidoglycan precursor (lipid II; Figure 1A). To study the catalytic activity of FmhB *in vitro*, we developed synthetic routes for analogues of these two substrates. The tRNA analogues were obtained by *in vitro* transcription of DNA templates obtained by PCR (Supplementary Material, section 2, Supplementary Tables S1 and S2, and Supplementary Figure S1). The lipid II analogues were obtained by extraction of the UDP-MurNAc-pentapeptide nucleotide precursor (Figure 1A) from the cytoplasm of *S. aureus* followed by *in vitro* transfer of the phospho-MurNAc-pentapeptide moiety to commercial phospho-di-prenyl or phospho-hepta-prenyl lipids using the purified transferase, MraY. GlcNAc was added to the resulting lipid I by the purified MurG transferase (Supplementary Material, sections 3 and 4). Hepta-prenyl- and di-prenyl-containing lipid II analogues were purified by butanol/pyridinium-acetate extraction (23) and by reverse-phase HPLC (24), respectively.

Synthesis of FmhB inhibitors

Stable analogues of Gly-tRNA^{Gly} were obtained by organic synthesis of dinucleotides pdCpA-2'-azido and pdCpA-3'-azido (25,26) (Supplementary Material, section 5 and Supplementary Figure S3), Cu^I-catalyzed cycloaddition of commercially available 1,8-nonadiyne (Sigma-Aldrich), and ligation to tRNA analogues devoid of the terminal CA dinucleotide using T4 RNA ligase (26) (Supplementary Material, section 6).

Enzyme assays

Enzymes were produced in *Escherichia coli* and purified by nickel-affinity and size-exclusion chromatography (Supplementary Material, section 3, and Supplementary Figure S2). The catalytic efficacy of FmhB, FemA and FemB was tested in a coupled assay involving acylation of tRNA analogues by a glycylyl-tRNA synthetase (GlyRS), which was used at a sufficiently high concentration (800 nM) to maintain full tRNA acylation during the entire reaction (24) (Supplementary Material, sections 7 and 8). Under the assay conditions the Gly-tRNA concentration ([S]) was negligible compared to K_m so that turnover was equal to $k_{cat} \times [S]/K_m$. Turnover was determined using several enzyme concentrations. Dividing turnover by [S] provided an estimate of the catalytic efficacy (k_{cat}/K_m) of FmhB for a particular tRNA, a relevant parameter for comparison of tRNAs with different sequences. Competitive inhibition of FmhB by stable Gly-tRNA^{Gly} analogues was assayed with a fixed and non-saturating concentration of Gly-tRNA^{Gly} containing the NP2 sequence and various concentrations of stable Gly-tRNA^{Gly} analogues. The inhibition parameter K_i was determined by fitting the Morrison equation to experimental data (27). Inhibition of FmhB following sequestration of Gly-tRNA^{Gly} by formation of a complex with EF-Tu•GTP was tested in the presence of EF-Ts and a solution of GTP that was pretreated with phosphoenolpyruvate kinase to remove any GDP (Supplementary Material, section 9, and Supplementary Table S3).

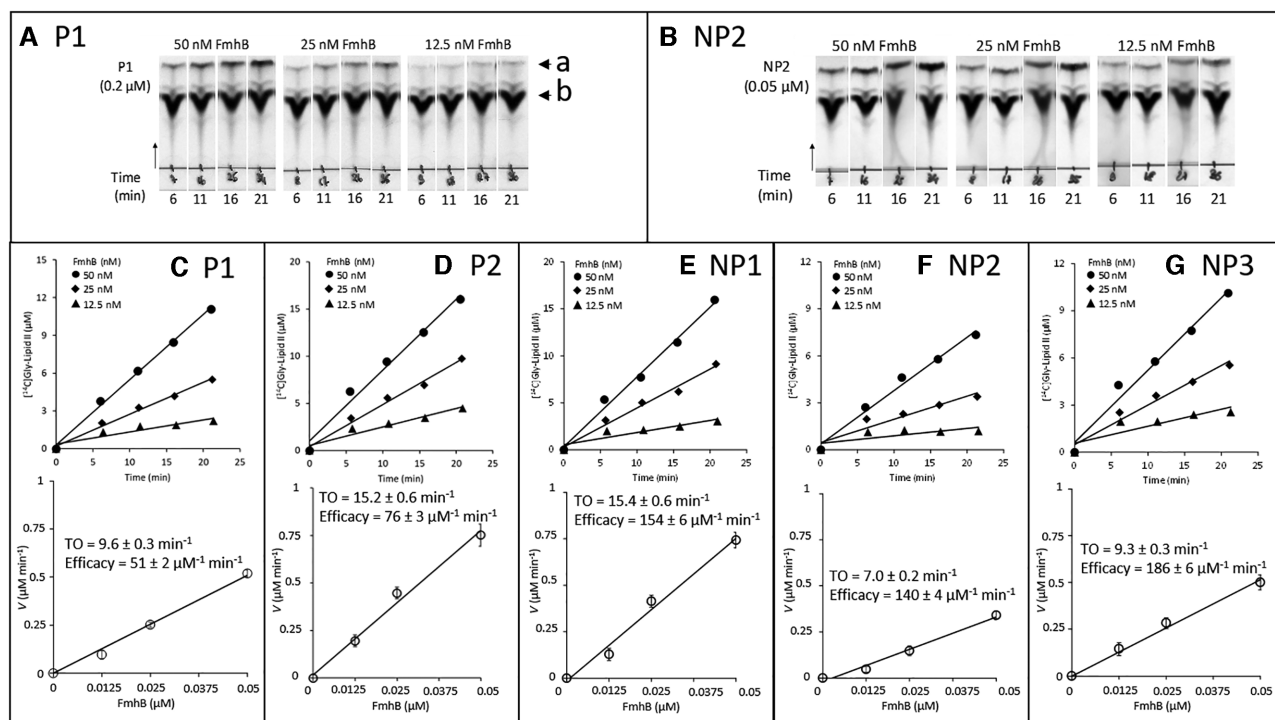


Figure 2. Impact of the tRNA sequence on the catalytic activity of FmhB in the coupled assay using the hepta-prenyl-containing lipid II analogue as substrate. (A and B) Representative autoradiographies of thin-layer chromatograms for kinetic analyses of FmhB with isoacceptors P1 and NP2, respectively. The arrow heads labeled with the letters a and b indicate the position of the radio-labeled product of the reaction ($[^{14}\text{C}]$ Gly-lipid II analogue) and of the $[^{14}\text{C}]$ Gly substrate, respectively. The arrow indicates the direction of migration. (C–G) Determination of FmhB activity with various tRNAs. For each isoacceptor, the top panel shows kinetics with three concentrations of FmhB using a fixed concentration of isoacceptor (0.2 μM for P1 and P2; 0.1 μM for NP1; 0.05 μM for NP2 and NP3). Preliminary investigations (data not shown) showed that these concentrations were rate limiting. The values of the velocity (V) of the formation of the radio-labeled product of the reactions ($[^{14}\text{C}]$ Gly-lipid II analogue) \pm standard deviation were obtained by fitting a first order equation to the data obtained for each enzyme concentration. For each isoacceptor, the bottom panel shows the determination of the turnover (TO; $V/\text{FmhB concentration}$) \pm standard deviation, which was obtained by fitting a first order equation to the data. Estimates of the efficacy of FmhB were obtained by dividing TO by the tRNA concentration.

Detection of FmhB•tRNA complexes by size-exclusion chromatography

Isoacceptors P1 or NP2 were incubated with a four-fold molar excess of FmhB and formation of complexes was determined by size-exclusion chromatography (Supplementary Material, section 10).

Assessment of the purity of compounds synthesized in this study

Chromatographic analyses of dinucleotides and RNAs are reported in sections 11 and 12 of the Supplementary Material, respectively.

RESULTS

Glycylation of the tRNA^{Gly} isoacceptors by the GlyRS glycyI-tRNA synthetase from *S. aureus*

Our first objective was to identify the conditions required for efficacious glycylation of tRNAs obtained by *in vitro* transcription and to determine the concentration of Gly-tRNA^{Gly}. The five tRNA^{Gly} isoacceptors of *S. aureus* contain the necessary identity determinants for glycylation, namely G¹-C⁷², C²-G⁷⁰ and U⁷³ in the acceptor stem and C³⁵ and C³⁶ in the anticodon (in bold in Figure 1B) (28).

Accordingly, and as previously described (15), the five isoacceptors generated by *in vitro* transcription were aminoacylated by the *S. aureus* GlyRS. We did not detect any significant difference in the yield or kinetics of acylation of the five isoacceptors (Supplementary Figure S4 and data not shown). A concentration of GlyRS of 0.8 μM was used in further experiments to ensure full acylation of the isoacceptors in the GlyRS-FmhB coupled assay. Data presented in Supplementary Figure S4 also showed that increasing concentrations of GlyRS led to plateaus in the amounts of $[^{14}\text{C}]$ Gly-tRNA^{Gly} that provided an accurate quantification of the tRNA^{Gly} isoacceptors obtained by *in vitro* transcription.

Relative efficacy of FmhB for glycyI transfer from the five aminoacylated tRNA^{Gly} isoacceptors to peptidoglycan precursors

The GlyRS-FmhB coupled assay was used to investigate the impact of differences in the tRNA^{Gly} isoacceptor sequences on the catalytic activity of FmhB. Addition of $[^{14}\text{C}]$ Gly to the hepta- and di-prenyl analogues of lipid intermediate II (lipid II) was determined by thin-layer chromatography followed by scintillation counting of radioactive spots identified by autoradiography (Figures 2 and 3; Table 1).

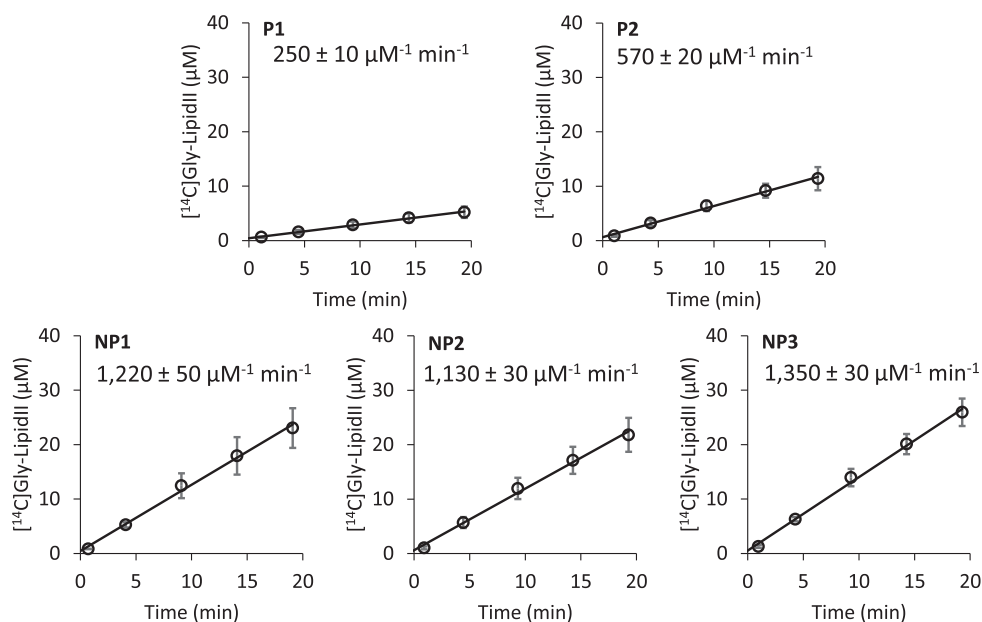


Figure 3. Impact of the tRNA sequence on the catalytic activity of FmhB in the coupled assay using the di-prenyl lipid II analogue as substrate. The coupled assay was performed with fixed concentrations of FmhB (20 nM), di-prenyl-containing lipid II analogue (60 μM), and tRNA isoacceptor (0.05 μM). Data are the mean \pm standard deviation of three independent experiments for each tRNA. The rate of formation of the radio-labeled product of the reaction ($[^{14}\text{C}]\text{Gly-lipid II}$ analogue) and the standard error were determined by fitting a linear equation to the data. The rate was divided by the concentration of FmhB and that of the tRNA to provide the indicated estimate of the efficacy of FmhB for each isoacceptor.

For the hepta-prenyl-containing lipid II, the relative efficacies of FmhB were determined with non-saturating concentrations of various isoacceptors (from 0.05 to 0.2 μM) and with three concentrations of FmhB (12.5, 25 and 50 nM) (Figure 2). The highest efficacy of FmhB was observed for the non-proteogenic isoacceptors (NP1, NP2 and NP3; 140–186 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$). The proteogenic isoacceptors were less effectively used by FmhB (P1 and P2; 51 \pm 2 and 76 \pm 3 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$).

The coupled assay used to generate the data presented in Figure 2 (above) requires the use of a detergent (Triton X-100; 1% final concentration in the assay) to solubilize the hepta-prenyl-containing lipid II analogue. To avoid any confounding factor linked to the use of a detergent and to facilitate substrate purification, we synthesized a soluble analogue of lipid intermediate II, which comprises two instead of seven prenyl units in the lipid moiety (Supplementary Figure S5). This water-soluble analogue was readily purified to homogeneity by reverse-phase HPLC and tested in the coupled assay with a non-saturating concentration (0.05 μM) of the isoacceptors and FmhB (20 nM) (Figure 3). FmhB displayed a higher efficacy with non-proteogenic than with proteogenic isoacceptors (1220 \pm 50; 1130 \pm 30; and 1350 \pm 30 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ for NP1, NP2 and NP3, respectively, versus 250 \pm 10 and 570 \pm 20 $\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ for P1 and P2, respectively) (Figure 3). Replacement of the hepta-prenyl by the di-prenyl moiety in lipid II analogues improved the efficacy of FmhB to similar extents for all five isoacceptors (from 4.9- to 8.1-fold; Table 1). These results indicate, as might be expected, that the specificity of FmhB for the isoacceptors is not altered by modification of the number of prenyl units in the lipid II analogues used as substrates. The higher FmhB efficacy observed with the solu-

Table 1. FmhB efficacy for hepta- or di-prenyl- containing lipid II substrates

tRNA ^{Gly} sequence	FmhB activity ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$) ^a		Fold change
	Hepta-prenyl lipid II	Di-prenyl lipid II	
P1	51 \pm 3	250 \pm 9	4.9 \pm 0.3
P2	76 \pm 6	570 \pm 26	7.5 \pm 0.7
NP1	154 \pm 13	1220 \pm 50	7.9 \pm 0.7
NP2	140 \pm 12	1130 \pm 50	8.1 \pm 0.8
NP3	186 \pm 8	1350 \pm 50	7.3 \pm 0.4

^a Values of FmhB efficacy with hepta- and di-prenyl-containing lipid II analogues are those reported in Figures 2 and 3, respectively. Errors for fold changes are calculated using the error propagation law.

ble lipid II analogue originates in part from a difference in the concentration of hepta- and di-prenyl-containing lipid II analogues used in the assay (30 μM versus 60 μM , respectively). In addition, the use of the soluble lipid II analogue might eliminate adverse effects of Triton X-100 on FmhB activity and on the accessibility of the substrate resulting from trapping of the hepta-prenyl-containing lipid II analogue in micelles.

Mapping FmhB specificity determinants in proteogenic and non-proteogenic tRNAs

Chimeric tRNAs harboring various portions of P1 and NP2 were constructed to identify regions of the isoacceptors that determine preferential usage of non-proteogenic tRNAs by FmhB (chimeras CHIM1, CHIM2, CHIM3, CHIM4 and CHIM5 in Figure 4A–C). Preliminary experiments showed that chimeras 1–5 were aminoacylated by GlyRS as effec-

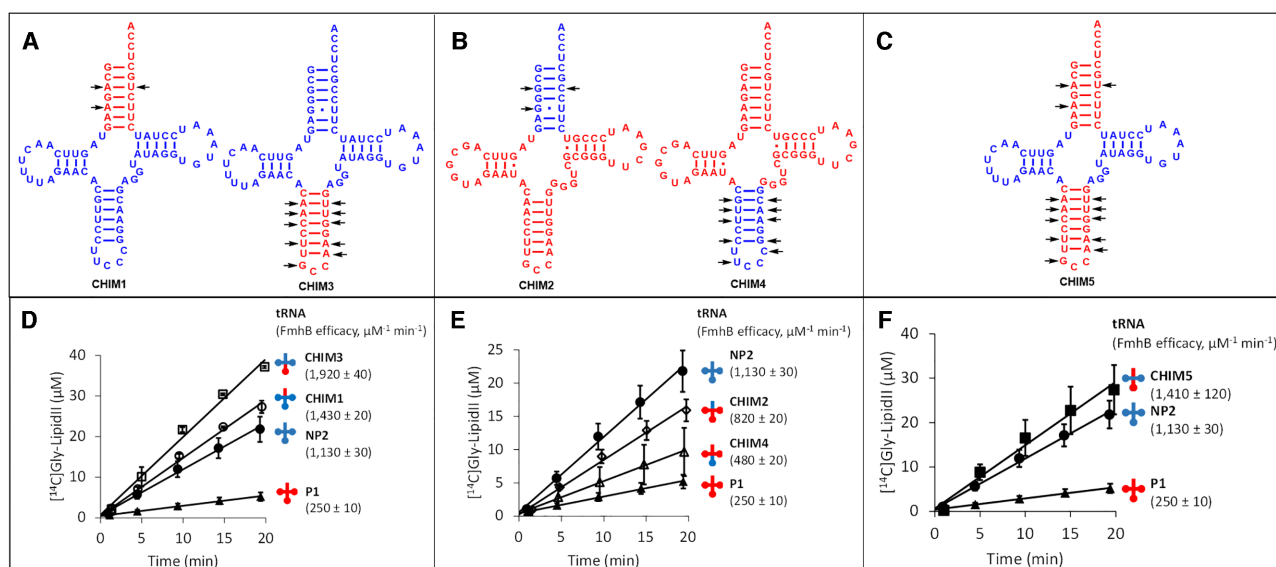


Figure 4. FmhB specificity determinants in proteogenic and non-proteogenic tRNAs. (A–C) Cloverleaf representation of chimeric tRNAs containing P1 (red) and NP2 (blue) moieties. Divergent nucleotides in the acceptor stem and anticodon stem and loop are indicated by arrows. (D–F) Catalytic activity of FmhB with chimeric tRNAs: the coupled assay was performed with fixed concentrations of FmhB (20 nM), di-prenyl-containing lipid II analogue (60 µM), and tRNA (0.05 µM). Data are the mean ± standard deviation of three independent experiments for each tRNA. The rate of the reaction and the standard error were determined by fitting a linear equation to the data. The rate of the reaction was divided by the concentration of FmhB and of the tRNA to provide an estimate of the efficacy of FmhB for each isoacceptor.

tively as P1 and NP2 (data not shown). These control experiments showed that differences in the efficacy of glycyI transfer from chimeric Gly-tRNA^{Gly} to the di-prenyl-containing lipid II analogue in the coupled assay could be attributed to differences in the activity of FmhB. As described above (Table 1), P1 is used 4.5-fold less effectively by FmhB than NP2 (250 ± 10 versus 1,130 ± 30 µM⁻¹ min⁻¹). We examined whether this difference could be specifically attributed to sequence polymorphisms restricted to the anticodon stem and loop or to the acceptor arm. Grafting the anticodon stem and loop of P1 onto NP2 (CHIM3) did not reduce (and in fact increased by 1.7-fold) the efficacy of the aminoacyl transfer reaction catalyzed by FmhB (1130 ± 30 versus 1920 ± 40 µM⁻¹ min⁻¹ for NP2 and CHIM3, respectively) (Figure 4D). Likewise, grafting the acceptor arm of P1 onto NP2 (CHIM1) did not reduce the efficacy of FmhB (1130 ± 30 versus 1430 ± 20 µM⁻¹ min⁻¹ for NP2 and CHIM1, respectively) (Figure 4D). A similar result was obtained for the graft of both the acceptor arm and anticodon stem and loop of P1 onto NP2 (1130 ± 30 versus 1410 ± 120 µM⁻¹ min⁻¹ for NP2 and CHIM5, respectively) (Figure 4C and F). These results suggest that neither the acceptor arm nor the anticodon stem and loop of NP2 contains any specificity determinant essential for effective aminoacyl transfer by FmhB. Conversely, these regions of P1 did not behave as anti-determinants in the context of the NP2 scaffold.

The role of the anticodon stem and loop and of the acceptor arm of NP2 in the context of the P1 scaffold was analyzed by constructing additional chimeras (Figure 4B and E). Grafting the anticodon stem and loop of NP2 onto P1 (CHIM4) moderately increased (1.9-fold) the aminoacyl transfer efficacy of FmhB (250 ± 10 and 480 ± 20 µM⁻¹ min⁻¹ for P1 and CHIM4, respectively). In agreement with the results obtained above in the context of the NP2 scaffold

(Figure 4A and D), these results indicate that the efficacy of the aminoacyl transfer by FmhB is not determined by sequence polymorphisms in the anticodon stem and loop moiety of the tRNAs. In contrast, grafting the acceptor arm of NP2 onto P1 (CHIM2, Figure 4E) unexpectedly increased the aminoacyl transfer efficacy by 3.3 fold (250 ± 10 and 820 ± 20 µM⁻¹ min⁻¹ for P1 and CHIM2, respectively). Thus, the acceptor arm of P1 might contain anti-determinants that function only in the context of the P1 scaffold.

In conclusion, results obtained with chimeras CHIM1–5 suggest that the efficacy of glycyI transfer catalyzed by FmhB is not determined by polymorphisms in the anticodon stem and loop of the tRNAs whereas data on the acceptor stem are inconclusive. The various parts of the tRNAs do not behave as independent entities and this obviously limits the power of analyses based on the construction of chimeras. This is particularly the case for the multiple interactions involving nucleotides in the T and D stems and loops. For this reason, we did not attempt the grafting approach for these tRNA moieties, which are the most likely candidates for the determination of the specificity of FmhB.

Detection of FmhB•tRNA complexes by size-exclusion chromatography

Binding of unacylated P1 and NP2 isoacceptors to FmhB was assayed by comparing the elution volume of the tRNA, FmhB, and a pre-incubated mixture of the two molecules (Figure 5 and Supplementary Figure S7 for the complete set of elution chromatograms recorded at 260 and 280 nm). A four-fold molar excess of FmhB was used to favor detection of shifts in the mobility of the tRNA at 260 nm. For P1, the chromatogram obtained for injection of a pre-

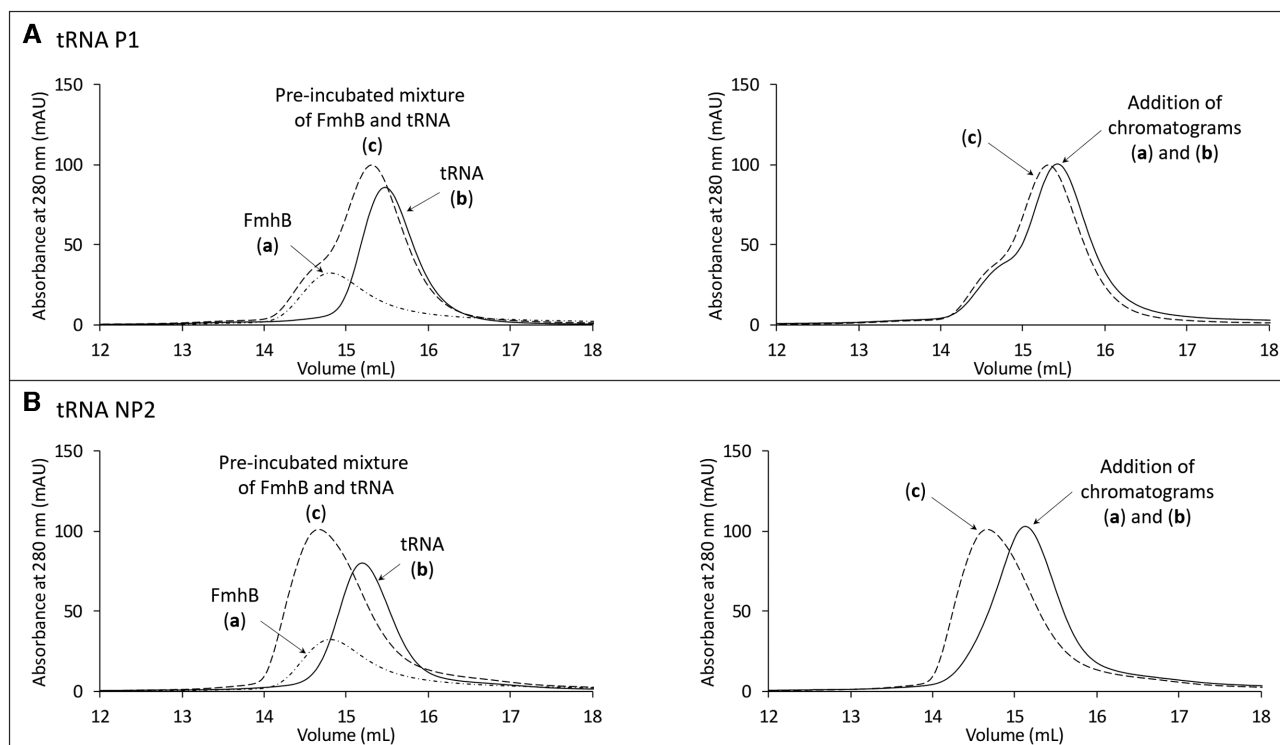


Figure 5. Size-exclusion chromatography of FmhB, tRNAs, and mixtures of these two molecules. P1 (A) and NP2 (B) were used as representatives of proteogenic and non-proteogenic tRNA^{Gly} isoacceptors. The superimposed chromatograms (left panel) correspond to the injection (300 μ l) of (a) FmhB alone (1200 pmol, $\epsilon_{280\text{ nm}} = 55\,800\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), (b) tRNA alone (300 pmol, $\epsilon_{280\text{ nm}} = 390\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$), or (c) a pre-incubated mixture of the same amounts of these two molecules. The superimposed chromatograms in the right panels correspond to the injection of the pre-incubated mixture of FmhB and the tRNA (chromatogram c in the left panels) and the addition of chromatograms (a) and (b) obtained by separate injections of FmhB and tRNA, respectively.

incubated mixture of FmhB and the tRNA was similar to the addition of the chromatograms independently obtained for separate injections of FmhB and P1. Thus, there was no detectable interaction between FmhB and P1 in this assay (Figure 5A). In contrast, FmhB shifted NP2 elution toward a lower volume indicating formation of a high-molecular weight FmhB•tRNA complex (Figure 5B). These results indicate that FmhB displays a higher affinity for NP2 than for P1.

Impact of tRNA sequence variations on FmhB inhibition by stable Gly-tRNA^{Gly} analogues

Our next objective was to indirectly estimate the relative affinity of FmhB for the tRNA^{Gly} isoacceptors based on a competitive inhibition assay. For this purpose, we designed stable Gly-tRNA^{Gly} analogues that bind to FmhB but cannot be used as substrates by this enzyme. Semi-synthesis was used to replace the ester bond connecting Gly to the terminal ribose by a 1,4-triazole ring substituted by an alkyne side chain (Figure 6A). The 1,4-triazole linker was chosen for this replacement since the heterocycle is stable and behaves as a bio-isoster of ester and amide bonds (25). The nonadiyne molecule was chosen as it may mimic the Lys residue of the second substrate (lipid II) and contribute to stabilization of the inhibitor in the FmhB catalytic cavity. A prerequisite for the determination of the relative affinity of FmhB for Gly-tRNA^{Gly} analogues was the comparison

of isomers containing the substituted triazole ring at the 2' or 3' position of the terminal ribose since both isomers are relevant *in vivo*. Indeed, GlyRSs are class II aminoacyl-tRNA synthetases known to acylate tRNAs at the 3' position (29,30) (Figure 6B). The same isomer is used by the ribosome (31). However, spontaneous isomerization between the 2' and 3' positions occurs in solution at neutral pH with a rate and a thermodynamic equilibrium in the order of 5 s⁻¹ and 1, respectively (32). Since this rapid equilibrium implies that the 3' and 2' isomers are both potential substrates of FmhB, we synthesized non-isomerizable Gly-tRNA^{Gly} analogues containing the substituted triazole at the 3' or 2' position (Figure 6D). Comparison of the 3' and 2' regioisomers containing the NP2 sequence revealed a 13-fold preference of FmhB for the 2' regioisomer (K_i of 8.6 ± 2.0 versus 110 ± 6 nM) (Figure 6E). The 2' isomers were therefore used to analyze the impact of variations in the sequence of the RNA moiety of Gly-tRNA^{Gly} analogues on the inhibition of FmhB.

Comparison of Gly-tRNA^{Gly} analogues containing the NP2 and P1 sequences revealed a 34-fold lower value of K_i for the former inhibitor (8.6 ± 2.0 versus 320 ± 10 nM) (Figure 6E). This observation indicates that FmhB displayed a 34-fold higher affinity for the inhibitor containing the NP2 sequence. This conclusion assumes a competitive inhibition mechanism (Figure 6C), which is highly likely considering the structure of the FmhB-related transferase FemX (33), which revealed a single binding site for the tRNA, and the

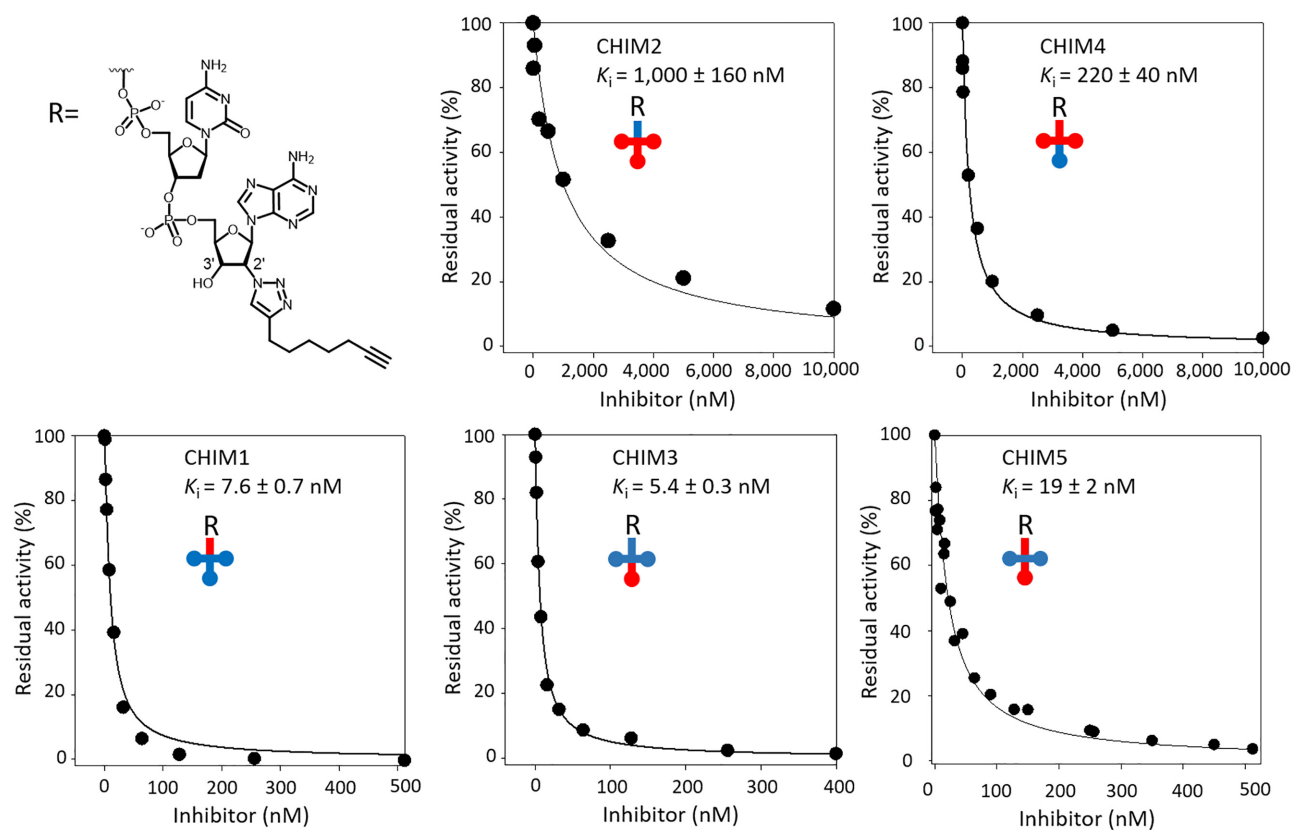


Figure 7. Competitive inhibition of FmhB by stable chimeric tRNA analogues. (A) Inhibition of FmhB by Gly-tRNA^{Gly} chimeric analogues containing a stable triazole ring. The color code highlights moieties of P1 (red) and NP2 (blue) in the sequence of chimeras CHIM1, CHIM2, CHIM3, CHIM4, and CHIM5. Chimeric analogues acted as competitive inhibitors enabling determination of K_i values by fitting the Morrison equation to experimental data. All inhibitors contained an alkyne-substituted 1,4-triazole ring linked to the 2' position of the terminal nucleotide.

structure of the substrate and the inhibitor, which only differs by the presence of an ester-linked glycyI group *versus* a triazole-linked alkyne chain.

Competitive inhibition was also tested with smaller Gly-tRNA^{Gly} analogues containing helices that only mimic the acceptor arm moiety of the tRNAs (Figure 6F). Similar K_i values were obtained for inhibitors based on the sequence of the P1 or NP2 acceptor arm (390 ± 80 versus 390 ± 60 nM, respectively, Figure 6E). This observation indicates that differences in the sequence of the P1 and NP2 acceptor arms did not modulate the affinity of FmhB for these inhibitors. In addition, the K_i values obtained with Gly-tRNA^{Gly} analogues containing the helices (390 ± 80 and 390 ± 60 nM) were similar to that obtained with the analogue containing the full tRNA sequence of P1 (320 ± 10 nM) but were significantly higher than that obtained with the analogue containing the full tRNA sequence of NP2 (8.6 ± 2.0 nM). This observation suggests that the affinity of FmhB for P1 is mainly determined by interactions involving the acceptor arm whereas NP2 forms additional contacts with the rest of the molecule.

Inhibition of FmhB by chimeric Gly-tRNA^{Gly} analogues

The inhibition assay depicted in Figure 6C was also performed with stable Gly-tRNA^{Gly} analogues containing the

chimeric tRNA sequences that were tested above as substrates (Figure 4). Inhibition of FmhB was not affected by grafting the anticodon stem and loop of P1 onto NP2 (K_i of 5.4 ± 0.3 nM versus 8.6 ± 2.0 nM for CHIM3 and NP2, respectively) (Figure 7). Likewise, grafting the acceptor stem of P1 onto NP2 did not affect the value of K_i (7.6 ± 0.7 nM versus 8.6 ± 2.0 nM for CHIM1 and NP2, respectively). Grafting both elements of P1 onto NP2 (anticodon stem and loop plus acceptor stem) had a minor impact on the affinity (19 ± 2 nM versus 8.6 ± 2.0 nM for CHIM5 and NP2, respectively). Thus, the chimeras obtained by grafting the anticodon stem and loop or the acceptor stem of P1 onto NP2 retained the properties of NP2, indicating that these tRNA moieties did not harbor any specificity determinant. The same conclusion was reached from modifications introduced in the P1 scaffold. Indeed, grafting the anticodon stem and loop of NP2 onto P1 led to a minor increase (1.5-fold) in the affinity of FmhB for the inhibitors (K_i of 220 ± 40 versus 320 ± 10 nM for CHIM4 and P1, respectively). Grafting the acceptor arm of NP2 onto P1 did not increase the affinity of FmhB (in fact, a significant 3.1-fold decrease in affinity was observed; K_i of 1000 ± 160 versus 320 ± 10 nM for CHIM2 and P1, respectively).

In conclusion, the results obtained by the analysis of stable Gly-tRNA^{Gly} analogues containing chimeric RNA moieties indicate that the higher affinity of FmhB for the in-

Table 2. Impact of the tRNA sequence on the catalytic efficacy of FmhB and its affinity for inhibitors

tRNA sequence	Amino acyl transfer catalyzed by FmhB		FmhB inhibition	
	Efficacy ($\mu\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$)	Fold change relative to P1	Affinity (nM)	Fold change relative to P1
tRNA^{Gly} Isoacceptor				
P1	250 ± 9	1	320 ± 10	1
NP2	1130 ± 30	4.5 ± 0.2	8.6 ± 2.0	37 ± 8
Chimeras with the NP2 scaffold				
CHIM3 (NP2 with the P1 anticodon stem and loop)	1920 ± 40	7.7 ± 0.3	5.4 ± 0.3	59 ± 4
CHIM1 (NP2 with the P1 acceptor stem)	1430 ± 20	5.7 ± 0.2	7.6 ± 0.7	42 ± 4
CHIM5 (NP2 with P1 anticodon stem and loop and acceptor stem)	1410 ± 120	5.6 ± 0.5	19 ± 2	17 ± 2
Chimeras with the P1 scaffold				
CHIM4 (P1 with the NP2 anticodon stem and loop)	480 ± 20	1.9 ± 0.1	220 ± 40	1.4 ± 0.2
CHIM2 (P1 with the NP2 acceptor stem)	820 ± 20	3.3 ± 0.2	1000 ± 160	0.32 ± 0.05

Errors for fold changes are calculated using the error propagation law.

hibitor containing the NP2 sequence rather than the P1 sequence is not due to sequence polymorphism in the anticodon stem and loop or in the acceptor arm of the RNA moieties of these inhibitors. Thus, the difference in affinity should be determined by the remaining moieties of the tRNAs comprising the D and T stems and loops. Comparison of inhibitors containing the chimeric tRNAs or only the tRNA acceptor stems suggests that the D and T stems and loops of NP2 contain identity determinants that are absent from P1. Our results also indicate that introduction of the anticodon stem and loop and of the acceptor arm of P1 into the NP2 scaffold did not impair FmhB binding. Thus, the competitive binding assay did not reveal the presence of any antideterminant in the sequence of P1.

Comparison of the results obtained in the inhibition and activity assays

The same modifications were introduced in the tRNA moiety of stable Gly-tRNA^{Gly} analogues tested as inhibitors of FmhB (Figure 7) and in the tRNAs used to generate the Gly-tRNA^{Gly} substrates of FmhB in the coupled assay (Figure 4). Table 2 provides a comparison of the impact of these modifications on the affinity of FmhB for the inhibitors and on the enzymatic efficacy of FmhB. Variations in affinity and efficacy resulting from modifications of the RNA sequences were expected to be positively correlated since the tRNAs were used at non-saturating concentrations in the coupled assay. The expected correlation was observed for NP2, P1, and all chimeras except CHIM2 (Table 2). In the latter case, grafting the NP2 acceptor arm onto P1 had opposite effects on affinity (a 0.3-fold decrease) and on efficacy (a 3.3-fold increase). The basis for this discrepancy remains unknown. The amplitude of the difference observed for comparison of NP2 and P1 was greater for FmhB inhibition (a 34-fold difference) than for FmhB efficacy (a 4.5-fold difference) (Table 2). This observation is not surprising since the K_i value depends upon the ratio of the off to on constant (k_{-1}/k_1) whereas the K_m Michaelis–Menten parameter additionally depends upon k_{cat} ($K_m = k_{-1}/(k_1 + k_{\text{cat}})$). In conclusion, analyses of tRNA chimeras in two independent assays, coupled assay and inhibition by stable Gly-tRNA^{Gly} analogues, revealed that preferential use of NP2 by FmhB is due to the presence of specificity determinants located in

the T and D stems and loops of the tRNA. The only discrepancy that was observed was a 3.3-fold improvement in FmhB efficacy for the introduction of the NP2 acceptor arm onto P1 in the coupled assay.

Mapping identity determinants in the D and T stems and loops of P1 and NP2

Sequence polymorphisms in the D and T stems and loops of the P1 and NP2 isoacceptors were clustered in four regions (Supplementary Results section 17 and Figure S9). Construction of chimeric tRNAs indicated that each of these four regions may act as identity determinants in the transferase and inhibition assays (Supplementary Figures S10 and S11, respectively). These results suggest that preferential recognition of NP2 by FmhB involves several identity determinants that are scattered in the sequence of the D and T stems and loops.

Competitive binding of Gly-tRNA^{Gly} to FmhB and EF-Tu

In the cytoplasm of *S. aureus*, FmhB and EF-Tu•GTP potentially compete for the same pool of Gly-tRNA^{Gly} resulting from acylation of the P1, P2, NP1, NP2, and NP3 isoacceptors by GlyRS. *In vitro*, binding of Gly-tRNA^{Gly} to EF-Tu•GTP is expected to inhibit FmhB by substrate sequestration (Figure 8A). Thus, residual FmhB activity in the presence of increasing concentrations of EF-Tu•GTP was used to determine whether differences in the sequence of the isoacceptors affect competitive binding to EF-Tu•GTP and FmhB (Figure 8B and C). Glycyl transfer was inhibited by EF-Tu•GTP in a concentration-dependent manner for the five isoacceptors. Inhibition was higher for proteogenic (P1 and P2) than for non-proteogenic (NP1, NP2 and NP3) isoacceptors. Qualitatively, these results indicated that binding of Gly-tRNA^{Gly} to EF-Tu•GTP inhibited the glycyl transfer reaction catalyzed by FmhB *in vitro*. The low affinity of EF-Tu•GTP for Gly-tRNA^{Gly} containing the NP1, NP2, and NP3 sequences (13) largely prevented this inhibition. Thus, the low affinity of EF-Tu•GTP for Gly-tRNA^{Gly}-containing non-proteogenic tRNA^{Gly} could help to ensure an adequate supply of activated Gly for synthesis of peptidoglycan precursors by FmhB.

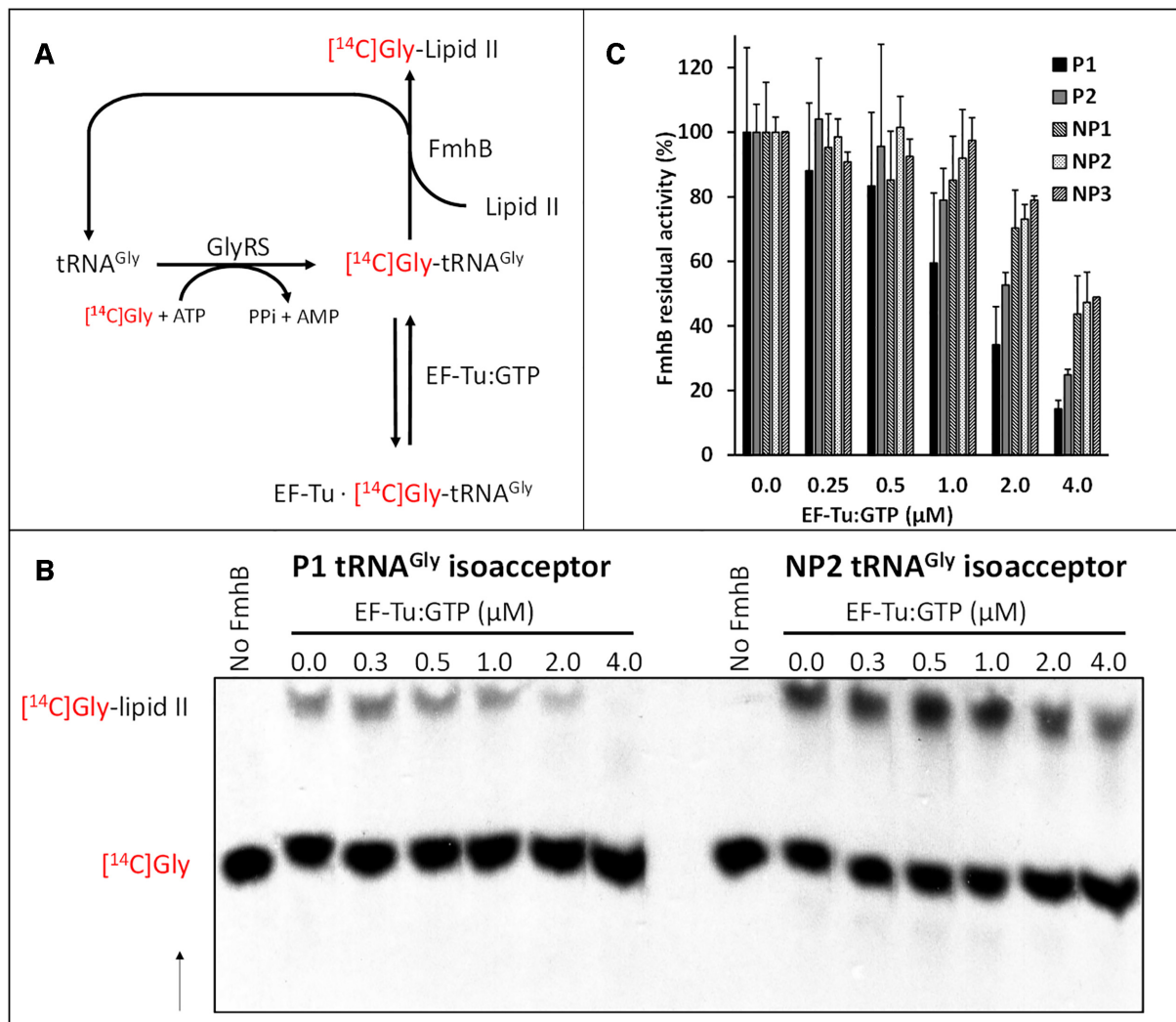


Figure 8. Inhibition of FmhB by EF-Tu-mediated sequestration of Gly-tRNA^{Gly}. (A) Reaction scheme illustrating how binding of Gly-tRNA^{Gly} to EF-Tu•GTP leads to FmhB inhibition. The residual transferase activity of FmhB in the presence of increasing concentrations of EF-Tu•GTP was determined by quantification of [¹⁴C]Gly added onto the di-prenyl-lipid II analogue (Supplementary Table S3). (B) Autoradiography providing a representative example of the separation of the substrates and products of the reaction by thin-layer chromatography. The arrow indicates the direction of solvent migration. (C) Residual transferase activity of FmhB (%) was determined in the presence of increasing concentrations of EF-Tu•GTP. Inhibition was tested at a fixed concentration (0.1 μM) of proteogenic (P1 and P2) and non-proteogenic (NP1, NP2 and NP3) tRNA^{Gly} isoacceptors.

Relative efficacy of FemA and FemB for glycylation transfer from the P1 and NP2 Gly-tRNA^{Gly} isoacceptors to peptidoglycan precursor analogues

Synthesis of the complete pentaglycine side chain requires two aminoacyl-transferases, FemA and FemB, in addition to FmhB (Figure 1). FemA and FemB were purified and used in the coupled assay with P1 and NP2 as representatives of the proteogenic and non-proteogenic tRNAs, respectively. FemA and FemB displayed a 2.6 ± 0.2 and 3.4 ± 0.3 -fold preference for the non-proteogenic tRNA, respectively (Supplementary Figure S6). FmhB displayed a 4.5 ± 0.2 -fold preference for NP2 (Table 2). These results indicate that the non-proteogenic tRNA NP2 is preferentially used by the three aminoacyl-transferases involved in the synthesis of the pentaglycine side chain of the peptidoglycan precursors of *S. aureus*.

DISCUSSION

Although aminoacylated tRNAs offer a source of activated amino acids for the development of biosynthetic pathways, this opportunity seems to have been exploited or retained in a very limited number of cases in the evolution of the three kingdoms of life. For example, peptidoglycan synthesis in bacteria almost exclusively involves ATP-dependent activation of the carbonyl groups of amino acids as acyl-phosphates (1,34–36). Participation of tRNAs in the synthesis of peptidoglycan precursors is restricted to the side chain, a structure present in a limited number of species, mainly among the firmicutes and the actinobacteria (1,37–42). One possible limitation to the development of non-ribosomal tRNA-dependent biosynthetic pathways may stem from the potentially negative impact of the depletion of a specific aminoacyl-tRNA pool. Indeed, codon usage

and the relative abundance of tRNAs have been adjusted to each other in complex ways during evolution to modulate the level of gene expression during translational elongation, to ensure the fidelity of translation, and to optimize protein folding as the latter is coupled to translation (see Rak *et al.* for a review) (43). The impact of variations in the relative abundance of tRNAs on these key cellular processes stems from the fact that aminoacyl-tRNAs compete to decode the same codon in the A site of the ribosome and that binding of aminoacyl-tRNAs to the A site is rate-limiting during elongation. In addition to bioinformatics analyses, experimental evidence has shown that modifications of the tRNA pools affect the fidelity of translation (44) and the rate of protein misfolding (45). Thus, the use of a large pool of aminoacyl-tRNAs for non-ribosomal synthesis is expected to be deleterious in the absence of a mechanism that maintains an adequate supply of aminoacyl-tRNAs for translation. Emergence of tRNA-dependent pathways may require the acquisition of mechanisms that ensure the harmonious partition of aminoacyl-tRNAs between the ribosomal and non-ribosomal synthesis pathways (13,46,47). From a quantitative standpoint, this requirement may be particularly important for the Fem pathway in *S. aureus* since this bacterium produces a thick peptidoglycan layer and Gly represents 5 out of the 10 amino acid residues present in the lipid II precursor (6,48–50) (Figure 1A). Quantitative estimates presented in the Supplementary Material (section 13, and supplementary Table S4) suggest that *ca.* 37% of the Gly-tRNA^{Gly} pool is directed toward protein synthesis and the remaining 63% toward peptidoglycan synthesis. The burden of the Fem pathway on the aminoacyl-tRNA pools is expected to be more limited in bacteria producing shorter side chains of mixed amino acid composition (39). The current study aimed to demonstrate the existence of mechanisms ensuring the harmonious partition of Gly-tRNA^{Gly} between translation and peptidoglycan synthesis and to identify tractable characteristics indicative of the co-evolution of the ribosomal and non-ribosomal pathways.

It is first important to recall that the sequence of the tRNAs specifying Gly and the kinetics of their acylation indicate that all isoacceptors are acylated by the same glycyl-tRNA synthetase with similar efficacies (15) (Supplementary Figure S4). The T-box riboswitch that regulates transcription of the gene encoding GlyRS in *S. aureus* responds to both proteinogenic and non-proteinogenic isoacceptors indicating that the supply of tRNA^{Gly} to the glycyl transferase can be adjusted in response to accumulation of both types of unacylated tRNAs by the same mechanism (51). Thus, the tRNA acylation step does not seem to involve any evolutionary characteristics relevant to the partition of aminoacyl-tRNAs. In contrast, the tRNA^{Gly} isoacceptors clearly fall in two classes, proteogenic (P1 and P2) and non-proteogenic (NP1, NP2 and NP3), defined by their interaction with FmhB (this study), EF-Tu•GTP (15,21), and the ribosome (16,18). Here we show that non-proteogenic tRNAs are preferentially used as substrates by FmhB (Figures 2 and 3) and that this preference at least partially involves a difference in the relative affinity of FmhB for the two types of tRNAs, as directly established by the detection of FmhB•tRNA complexes by size-exclusion chromatography (Figure 5) and indirectly established by the competitive inhi-

bition of FmhB by stable Gly-tRNA^{Gly} analogues (Figures 6 and 7). Thus, limited recognition of proteogenic tRNAs P1 and P2 by FmhB may contribute to ensure an adequate supply of aminoacyl-tRNAs for protein synthesis. Qualitatively, we also showed that EF-Tu•GTP inhibits FmhB *in vitro* by sequestering its substrate and that this inhibition is weaker for Gly-tRNA^{Gly} composed of non-proteogenic tRNAs (Figure 8), in agreement with the lower affinity of EF-Tu•GTP for these aminoacyl-tRNAs (15,52–55). These observations are relevant to the *in vivo* situation since the cytoplasmic concentration of EF-Tu is thought, at least in *E. coli*, to exceed that of aminoacylated tRNAs, which are present at a very low concentration in the free form due to the formation of high-affinity EF-Tu•GTP•aminoacyl-tRNA complexes (56,57). Together, these results indicate that the potential adverse impact of the competition between the two pathways for the Gly-tRNA^{Gly} pool is restricted by both limited recognition of non-proteogenic tRNAs by EF-Tu•GTP and limited recognition of proteogenic tRNAs by FmhB.

The basis for the lower affinity of EF-Tu•GTP for non-proteogenic than for proteogenic Gly-tRNAs can be deduced from the comparison of the sequences of the two types of tRNAs and the known sequence-specificity of EF-Tu. Recognition of both the tRNA body and the esterified amino acid contributes to the affinity of EF-Tu•GTP for aminoacyl-tRNAs (53). Variations in the thermodynamic contribution of these two interactions compensate for each other so that the affinity of EF-Tu•GTP for all proteogenic aminoacyl-tRNAs is similar, a feature thought to be of paramount importance for effective and accurate decoding of messenger RNAs by the ribosome (53). The variations in the affinity of EF-Tu•GTP for the tRNA body of aminoacyl-tRNAs are nearly exclusively determined by the first three base pairs of the T stem (54). The role of these six nucleotide residues in determining the relative binding affinity of EF-Tu•GTP for the tRNA body of aminoacyl-tRNAs is universally conserved in bacteria in spite of extensive sequence diversity in this portion of the T stem (55). The thermodynamic contribution of each of the three base pairs is additive enabling similar affinities to be reached with various nucleotide combinations (52). The contribution of the esterified amino acid to the binding affinity of EF-Tu•GTP for aminoacyl-tRNAs is one of the lowest for glycine, and consequently, this is compensated for by one of the highest affinities for the tRNA^{Gly} bodies (52,54). In *S. aureus*, the proteogenic P1 and P2 isoacceptors display, as expected, high-affinity base-pair combinations at the first three positions of the T stem (G⁴⁹•U⁶⁵, C⁵⁰•G⁶⁴ or U⁵⁰•A⁶⁴ and G⁵¹•C⁶³, respectively, Figure 1C) (15,55). In contrast, the T stems of the NP1, NP2, and NP3 non-proteogenic tRNAs contain a less 'tight' base-pair combination (A⁴⁹•U⁶⁵, U⁵⁰•A⁶⁴ and A⁵¹•U⁶³) with ΔG° values (-9.6 ± 0.3 and -9.7 ± 0.2 kcal mol⁻¹, as estimated by two methods) significantly higher than the mean ΔG° value (-10.8 kcal mol⁻¹) of bacterial Gly-tRNAs (a 7.9-fold increase in K_D , from 8.8 to 69 nM) (55). This difference could account for the lower relative affinity of EF-Tu•GTP for the aminoacyl-tRNAs containing the NP1, NP2 or NP3 tRNA body rather than the P1 or P2 body reported by Giannouli *et al.* (15), based on a qualitative assay involving the determination of the salt

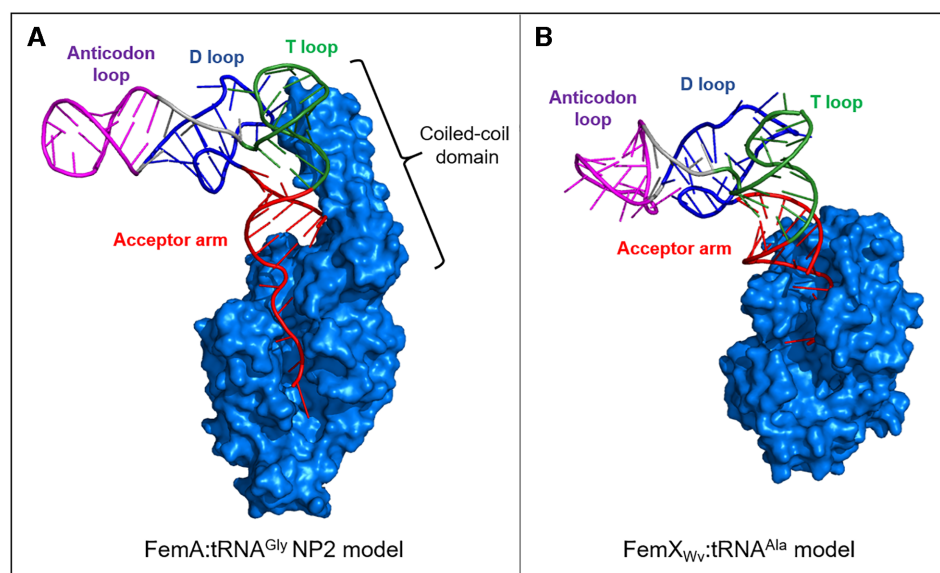


Figure 9. Models for tRNA recognition by aminoacyl-transferases of the Fem family. (A) FemA from *S. aureus* (58) in interaction with non-proteogenic isoacceptor NP2. (B) FemX_{WV} from *Weissella viridescens* in interaction with tRNA^{Ala} (59). Construction of models for tRNA recognition by the Fem aminoacyl-transferases is described in section 15 of the Supplementary Material.

concentration required to elute aminoacyl-tRNAs bound to EF-Tu•GTP immobilized on a solid support (15). This difference could also account for the difference in affinity between the two types of aminoacyl-tRNAs revealed by the competitive inhibition of FmhB by EF-Tu•GTP (Figure 8).

Since bias in codon usage affects the turnover of specific aminoacyl-tRNAs, the decoding characteristics of the isoacceptors should be considered in the analysis of the partition of Gly-tRNA^{Gly} between peptidoglycan and protein synthesis. As detailed in section 14 of the Supplementary Material, differences in the anticodons of proteogenic and non-proteogenic isoacceptors do not appear to play a role in tRNA partition.

Since partition of the isoacceptors between translation and peptidoglycan synthesis can be achieved by the presence of nucleotide polymorphisms that favor (determinants) or disfavor (anti-determinants) the interaction of isoacceptors with EF-Tu and FmhB, we determined whether functional differences could be traced to specific regions of the tRNAs. By using tRNA chimeras in the GlyRS-FmhB coupled assay (Figure 4) and stable Gly-tRNA^{Gly} analogues in the competitive binding assay (Figures 6 and 7), the relevant polymorphisms were found to be located in the T and D stems and loops of the tRNAs rather than in their anticodon stem and loop or acceptor arm. The use of inhibitors comprising only the tRNA acceptor arm led to the conclusion that the T and D stems and loops of NP2 harbor specificity determinants that may account for the higher affinity of FmhB for this non-proteogenic tRNA. The T and D stems and loops of NP2 may interact with the coiled-coil domain of FmhB as illustrated by the FemA:NP2 interaction model presented in Figure 9A. It is worth noting that the aminoacyl-transferase FemX_{WV} from *Weissella viridescens* is devoid of the coiled-coil domain and recognizes Ala-tRNA^{Ala} by a distinct mechanism exclusively involving the acceptor arm (Figure 9B). This was established

both by biochemical and structural approaches that led to the crystallization of FemX_{WV} with a ‘bi-substrate’ comprising mimics of the peptidoglycan precursor and the tRNA^{Ala} acceptor arm (33). The current study indicates that deciphering the molecular mechanism of tRNA^{Gly} recognition by FmhB will require the challenging co-crystallization of FmhB with a molecule comprising the entire tRNA^{Gly} sequence since relevant interactions are scattered through several regions of the tRNA^{Gly} molecule.

The evolutionary origin of the sequence polymorphisms in proteogenic and non-proteogenic tRNAs was investigated by constructing a phylogenetic tree with the sequence of tRNA^{Gly} isoacceptors from a selected set of Gram-positive bacteria (Supplementary Material, section 16, Supplementary Table S5, and Figure S8). The non-proteogenic tRNAs NP1, NP2, and NP3, which are preferentially recognized by FmhB, form a distinct cluster, which is present in bacteria producing pentaglycine-containing peptidoglycan precursors and is notably absent from other bacteria. These observations suggest that the sequence of non-proteogenic tRNAs may have evolved to retain efficacious acylation by GlyRS and to minimize binding to EF-Tu•GTP (52,53,60), thus providing an adequate supply of aminoacyl-tRNAs for synthesis of peptidoglycan precursors by FmhB. In turn, FmhB may have evolved to preferentially use non-proteogenic isoacceptors, leaving the pool of proteogenic tRNA^{Gly}, which is similar to that of other firmicutes, available for protein synthesis.

The production of additional ‘non-proteogenic’ tRNAs preferentially participating in peptidoglycan synthesis has so far only been detected in *S. aureus* and *S. epidermidis* (13,55). This notion has been thoroughly explored in *S. pneumoniae* (61). In this bacterium, the MurM transferase is responsible for incorporation of the first residue of the Ala-Ala or Ser-Ala side chain of peptidoglycan precursors (62). *S. pneumoniae* is unusual among the firmicutes as the com-

position of the side chain is variable with a preponderance of L-Ala or L-Ser at the first position depending upon the presence of mosaic *murM* alleles generated by horizontal gene transfer (61,63). *S. pneumoniae* is also unusual as the peptidoglycan of certain clinical isolates mainly contains direct cross-links lacking the side chain, D-Ala⁴→L-Lys³ instead of D-Ala⁴→side chain-L-Lys³, due to the presence of *murM* alleles encoding weakly active transferases (62). In contrast, the sequence of the cross-links is generally uniformly conserved in members of the same species, a conservation that led to the historical proposal of using peptidoglycan structure for taxonomic purposes (37). In common with other firmicutes, the side chain is required for the expression of acquired β-lactam resistance in *S. pneumoniae* (penicillin resistance is clinically relevant in this case), as found for the pentaglycine side chain of methicillin-resistant *S. aureus* and the L-Ala-L-Ala side chain of cephalosporin-resistant *E. faecalis* (38). In clinical isolates of *S. pneumoniae*, variations in the relative abundance of tRNA^{Ser} and tRNA^{Ala} were reported to correlate with incorporation of Ser and of Ala into the side chain of peptidoglycan precursors but this was not associated with any modification of the tRNA gene sequences (61). These results suggest that Fem transferases and EF-Tu•GTP compete for the same tRNA pool in most firmicutes, possibly with an adjustment of the tRNA concentration. However, a completely different type of interaction of Fem transferases with components of the translation machinery, i.e. editing of misacylated tRNAs, was detected in *S. pneumoniae* (64). In this bacterium, tRNA^{Phe} contains an unusual U⁴•C⁶⁹ mismatch that mimics the G³•U⁷⁰ identity determinant of alanyl-tRNA synthetase (AlaRS), leading to synthesis of Ala-tRNA^{Phe} and Ser-tRNA^{Phe}. These misacylated tRNAs produced by AlaRS escape the editing activity of PheRS as the U⁴•C⁶⁹ mismatch acts as an anti-determinant for deacylation of Ala-tRNA^{Phe} by PheRS and this enzyme does not display any editing activity with tRNA^{Phe} misacylated with Ser. Purified MurM was found to deacylate Ala-tRNA^{Phe} and Ser-tRNA^{Phe} as well as tRNA^{Ala} misacylated with Ser by AlaRS (64). It was thus proposed that MurM could contribute to the fidelity of translation by eliminating misacylated Ala-tRNA^{Phe}, Ser-tRNA^{Phe} and Ser-tRNA^{Ala}, and perhaps, productively direct the corresponding activated amino acids toward peptidoglycan synthesis. Although MurM is dispensable for growth in laboratory conditions, this enzyme may have a significant contribution *in vivo*, in addition to its role in penicillin resistance, since the harsh conditions that prevail during infection, in particular the presence of reactive oxygen species such as H₂O₂, are known to increase the rate of tRNA misacylation (43).

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Zainab Edoe for proofreading the manuscript.

FUNDING

Agence Nationale pour la Recherche [ANR-17-CE07-0041-02 (SyntRNA to M.E.Q. and M.A.)]; L.R. was funded by a Sorbonne Université doctoral contract. Funding for open access charge: ANR [ANR-17-CE07-0041-02].

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Mainardi,J.L., Villet,R., Bugg,T.D., Mayer,C. and Arthur,M. (2008) Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 386–408.
- Moutiez,M., Belin,P. and Gondry,M. (2017) Aminoacyl-tRNA-utilizing enzymes in natural product biosynthesis. *Chem. Rev.*, **117**, 5578–5618.
- Fields,R.N. and Roy,H. (2018) Deciphering the tRNA-dependent lipid aminoacylation systems in bacteria: novel components and structural advances. *RNA Biol.*, **15**, 480–491.
- Watanabe,K., Toh,Y., Suto,K., Shimizu,Y., Oka,N., Wada,T. and Tomita,K. (2007) Protein-based peptide-bond formation by aminoacyl-tRNA protein transferase. *Nature*, **449**, 867–871.
- Rohrer,S. and Berger-Bachi,B. (2003) FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta-lactam resistance in gram-positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 837–846.
- Schneider,T., Senn,M.M., Berger-Bachi,B., Tossi,A., Sahl,H.G. and Wiedemann,I. (2004) In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.*, **53**, 675–685.
- Rohrer,S., Ehlert,K., Tschierske,M., Labischinski,H. and Berger-Bachi,B. (1999) The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *PNAS*, **96**, 9351–9356.
- Monteiro,J.M., Covas,G., Rausch,D., Filipe,S.R., Schneider,T., Sahl,H.G. and Pinho,M.G. (2019) The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity. *Sci. Rep.*, **9**, 5010.
- Hübscher,J., Jansen,A., Kotte,O., Schäfer,J., Majcherczyk,P.A., Harris,L.G., Bierbaum,G., Heinemann,M. and Berger-Bächi,B. (2007) Living with an imperfect cell wall: compensation of femAB inactivation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics*, **8**, 307.
- de Lencastre,H. and Tomasz,A. (1994) Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 2590–2598.
- Kopp,U., Roos,M., Wecke,J. and Labischinski,H. (1996) Staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge biosynthesis: a novel antistaphylococcal target? *Microb. Drug Resist.*, **2**, 29–41.
- Hegde,S.S. and Shrader,T.E. (2001) FemABX family members are novel nonribosomal peptidyltransferases and important pathogen-specific drug targets. *J. Biol. Chem.*, **276**, 6998–7003.
- Shepherd,J. and Ibba,M. (2013) Direction of aminoacylated transfer RNAs into antibiotic synthesis and peptidoglycan-mediated antibiotic resistance. *FEBS Lett.*, **587**, 2895–2904.
- Green,C.J. and Vold,B.S. (1993) *Staphylococcus aureus* has clustered tRNA genes. *J. Bacteriol.*, **175**, 5091–5096.
- Giannouli,S., Kyritsis,A., Malissovova,N., Becker,H.D. and Stathopoulos,C. (2009) On the role of an unusual tRNA^{Gly} isoacceptor in *Staphylococcus aureus*. *Biochimie*, **91**, 344–351.
- Bumsted,R.M., Dahl,J.L., Soll,D. and Strominger,J.L. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. X. Further study of the glycyl transfer ribonucleic acids active in peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **243**, 779–782.
- Petit,J.F., Strominger,J.L. and Soll,D. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. VII. Incorporation of serine and glycine into interpeptide bridges in *Staphylococcus epidermidis*. *J. Biol. Chem.*, **243**, 757–767.
- Stewart,T.S., Roberts,R.J. and Strominger,J.L. (1971) Novel species of tRNA. *Nature*, **230**, 36–38.
- Roberts,R.J. (1974) Staphylococcal transfer ribonucleic acids. II. Sequence analysis of isoaccepting glycine transfer ribonucleic acids

- IA and IB from *Staphylococcus epidermidis* Texas 26. *J. Biol. Chem.*, **249**, 4787–4796.
20. Roberts, R.J. (1972) Structures of two glycyl-tRNAs from *Staphylococcus epidermidis*. *Nat.: New Biol.*, **237**, 44–45.
 21. Kawakami, M., Tanada, S. and Takemura, S. (1975) Properties of alanyl-oligonucleotide, puromycin, and *Staphylococcus epidermidis* glycyl-tRNA in interaction with elongation factor Tu:GTP complex. *FEBS Lett.*, **51**, 321–324.
 22. Chang, A.T. and Nikonowicz, E.P. (2012) Solution nuclear magnetic resonance analyses of the anticodon arms of proteinogenic and nonproteinogenic tRNAGly. *Biochemistry*, **51**, 3662–3674.
 23. Hyland, S.A. and Anderson, M.S. (2003) A high-throughput solid-phase extraction assay capable of measuring diverse polyprenyl phosphate: sugar-1-phosphate transferases as exemplified by the WeeA, MraY, and MurG proteins. *Anal. Biochem.*, **317**, 156–165.
 24. Fonvielle, M., Bouhss, A., Hoareau, C., Patin, D., Mengin-Lecreulx, D., Iannazzo, L., Sakkas, N., El Sagheer, A., Brown, T., Etheve-Quellejeu, M. et al. (2018) Synthesis of lipid-carbohydrate-peptidyl-RNA conjugates to explore the limits imposed by the substrate specificity of cell wall enzymes on the acquisition of drug resistance. *Chem. Eur. J.*, **24**, 14911–14915.
 25. Fonvielle, M., Mellal, D., Patin, D., Lecerf, M., Blanot, D., Bouhss, A., Santarem, M., Mengin-Lecreulx, D., Sollogoub, M., Arthur, M. et al. (2013) Efficient access to peptidyl-RNA conjugates for picomolar inhibition of non-ribosomal FemX(Wv) aminoacyl transferase. *Chem. Eur. J.*, **19**, 1357–1363.
 26. Chemama, M., Fonvielle, M., Villet, R., Arthur, M., Valery, J.M. and Etheve-Quellejeu, M. (2007) Stable analogues of aminoacyl-tRNA for inhibition of an essential step of bacterial cell-wall synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12642–12643.
 27. Copeland, R.A. (2005) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists. *Methods Biochem. Anal.*, **46**, 1–265.
 28. Nameki, N., Tamura, K., Asahara, H. and Hasegawa, T. (1997) Recognition of tRNA(Gly) by three widely diverged glycyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Biol.*, **268**, 640–647.
 29. Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. and Moras, D. (1990) Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, **347**, 203–206.
 30. Niyomporn, B., Dahl, J.L. and Strominger, J.L. (1968) Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. IX. Purification and properties of glycyl transfer ribonucleic acid synthetase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **243**, 773–778.
 31. Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, **289**, 920–930.
 32. Taiji, M., Yokoyama, S. and Miyazawa, T. (1983) Transacylation rates of aminoacyladenine moiety at the 3'-terminus of aminoacyl-transfer ribonucleic acid. *Biochemistry*, **22**, 3220–3225.
 33. Fonvielle, M., Li de, La, Sierra-Gallay, I., El-Sagheer, A.H., Lecerf, M., Patin, D., Mellal, D., Mayer, C., Blanot, D., Gale, N., Brown, T. et al. (2013) The structure of FemX(Wv) in complex with a peptidyl-RNA conjugate: mechanism of aminoacyl transfer from Ala-tRNA(Ala) to peptidoglycan precursors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 7278–7281.
 34. Bouhss, A., Mengin-Lecreulx, D., Blanot, D., van Heijenoort, J. and Parquet, C. (1997) Invariant amino acids in the Mur peptide synthetases of bacterial peptidoglycan synthesis and their modification by site-directed mutagenesis in the UDP-MurNAc:L-alanine ligase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **36**, 11556–11563.
 35. Bellais, S., Arthur, M., Dubost, L., Hugonnet, J.E., Gutmann, L., van Heijenoort, J., Legerand, R., Brouard, J.P., Rice, L. and Mainardi, J.L. (2006) Aslfm, the D-aspartate ligase responsible for the addition of D-aspartic acid onto the peptidoglycan precursor of *Enterococcus faecium*. *J. Biol. Chem.*, **281**, 11586–11594.
 36. Barreteau, H., Kovac, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S. and Blanot, D. (2008) Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 168–207.
 37. Schleifer, K.H. and Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407–477.
 38. Bouhss, A., Josseume, N., Allanic, D., Crouvoisier, M., Gutmann, L., Mainardi, J.L., Mengin-Lecreulx, D., van Heijenoort, J. and Arthur, M. (2001) Identification of the UDP-MurNAc-pentapeptide:L-alanine ligase for synthesis of branched peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.*, **183**, 5122–5127.
 39. Dare, K. and Ibba, M. (2012) Roles of tRNA in cell wall biosynthesis. *Wiley Interdiscip. Rev.: RNA*, **3**, 247–264.
 40. Hong, H.J., Hutchings, M.I., Hill, L.M. and Buttner, M.J. (2005) The role of the novel Fem protein VanK in vancomycin resistance in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 13055–13061.
 41. Hong, H.J., Hutchings, M.I., Neu, J.M., Wright, G.D., Paget, M.S. and Buttner, M.J. (2004) Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (vanK) required for drug resistance. *Mol. Microbiol.*, **52**, 1107–1121.
 42. Fiser, A., Filipe, S.R. and Tomasz, A. (2003) Cell wall branches, penicillin resistance and the secrets of the MurM protein. *Trends Microbiol.*, **11**, 547–553.
 43. Rak, R., Dahan, O. and Pilpel, Y. (2018) Repertoires of tRNAs: the couplers of genomics and proteomics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **34**, 239–264.
 44. Kramer, E.B. and Farabaugh, P.J. (2007) The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. *RNA*, **13**, 87–96.
 45. Yona, A.H., Bloom-Ackermann, Z., Frumkin, I., Hanson-Smith, V., Charpak-Amikam, Y., Feng, Q., Boeke, J.D., Dahan, O. and Pilpel, Y. (2013) tRNA genes rapidly change in evolution to meet novel translational demands. *Elife*, **2**, e01339.
 46. Shepherd, J. and Ibba, M. (2015) Bacterial transfer RNAs. *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**, 280–300.
 47. Blanquet, S., Mechulam, Y. and Schmitt, E. (2000) The many routes of bacterial transfer RNAs after aminoacylation. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **10**, 95–101.
 48. Matsuhashi, M., Dietrich, C.P. and Strominger, J.L. (1965) Incorporation of glycine into the cell wall glycopeptide in *Staphylococcus aureus*: role of sRNA and lipid intermediates. *PNAS*, **54**, 587–594.
 49. Wyatt, P.J. (1970) Cell wall thickness, size distribution, refractive index ratio and dry weight content of living bacteria (*Staphylococcus aureus*). *Nature*, **226**, 277–279.
 50. Vollmer, W. and Seligman, S.J. (2010) Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol.*, **18**, 59–66.
 51. Apostolidi, M., Saad, N.Y., Drinas, D., Pournaras, S., Becker, H.D. and Stathopoulos, C. (2015) A glyS T-box riboswitch with species-specific structural features responding to both proteinogenic and nonproteinogenic tRNAGly isoacceptors. *RNA*, **21**, 1790–1806.
 52. Schrader, J.M., Chapman, S.J. and Uhlenbeck, O.C. (2009) Understanding the sequence specificity of tRNA binding to elongation factor Tu using tRNA mutagenesis. *J. Mol. Biol.*, **386**, 1255–1264.
 53. LaRiviere, F.J., Wolfson, A.D. and Uhlenbeck, O.C. (2001) Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science*, **294**, 165–168.
 54. Uhlenbeck, O.C. and Schrader, J.M. (2018) Evolutionary tuning impacts the design of bacterial tRNAs for the incorporation of unnatural amino acids by ribosomes. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **46**, 138–145.
 55. Schrader, J.M. and Uhlenbeck, O.C. (2011) Is the sequence-specific binding of aminoacyl-tRNAs by EF-Tu universal among bacteria? *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9746–9758.
 56. Klumpp, S., Scott, M., Pedersen, S. and Hwa, T. (2013) Molecular crowding limits translation and cell growth. *PNAS*, **110**, 16754–16759.
 57. Tubulekas, I. and Hughes, D. (1993) Growth and translation elongation rate are sensitive to the concentration of EF-Tu. *Mol. Microbiol.*, **8**, 761–770.
 58. Benson, T.E., Prince, D.B., Mutchler, V.T., Curry, K.A., Ho, A.M., Sarver, R.W., Hagadorn, J.C., Choi, G.H. and Garlick, R.L. (2002) X-ray crystal structure of *Staphylococcus aureus* FemA. *Structure*, **10**, 1107–1115.
 59. Villet, R., Fonvielle, M., Busca, P., Chemama, M., Maillard, A.P., Hugonnet, J.E., Dubost, L., Marie, A., Josseume, N., Mesnage, S. et al. (2007) Idiosyncratic features in tRNAs participating in bacterial cell wall synthesis. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6870–6883.
 60. Sanderson, L.E. and Uhlenbeck, O.C. (2007) The 51–63 base pair of tRNA confers specificity for binding by EF-Tu. *RNA*, **13**, 835–840.
 61. Lloyd, A.J., Gilbey, A.M., Blewett, A.M., De Pascale, G., El Zoeiby, A., Levesque, R.C., Catherwood, A.C., Tomasz, A., Bugg, T.D., Roper, D.I. et al. (2008) Characterization of tRNA-dependent peptide bond

- formation by MurM in the synthesis of *Streptococcus pneumoniae* peptidoglycan. *J. Biol. Chem.*, **283**, 6402–6417.
62. Filipe, S.R., Severina, E. and Tomasz, A. (2001) Functional analysis of *Streptococcus pneumoniae* MurM reveals the region responsible for its specificity in the synthesis of branched cell wall peptides. *J. Biol. Chem.*, **276**, 39618–39628.
63. Filipe, S.R., Severina, E. and Tomasz, A. (2002) The murMN operon: a functional link between antibiotic resistance and antibiotic tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *PNAS*, **99**, 1550–1555.
64. Shepherd, J. and Ibba, M. (2013) Lipid II-independent trans editing of mischarged tRNAs by the penicillin resistance factor MurM. *J. Biol. Chem.*, **288**, 25915–25923.

CHAPITRE II : Etude de la spécificité des transférases de la famille Fem de *S. aureus* pour leurs substrats lipidiques (lipides II).

Les transférases de la famille Fem ont deux substrats, les Gly-ARNt^{Gly} et leur substrat lipide II respectif (**Figure 13**). Jusqu'à présent la nature insoluble des substrats lipidiques n'avait permis de réaliser que des études qualitatives ne menant qu'à l'identification des substrats respectifs des enzymes (Schneider et al., 2004). Aucun paramètre cinétique tels que les vitesses de réaction, les « turn over » (TO) ou les activités spécifiques des enzymes pour leurs substrats n'a été décrit dans la littérature. De même, les mécanismes enzymatiques des transférases Fem de *S. aureus* et leurs modes de reconnaissances des différents substrats lipidiques n'ont pas été étudiés. Ainsi de nombreuses questions restent encore à élucider. Pourquoi FmhB ne catalyse qu'une seule réaction enzymatique tandis que FemA et FemB en catalysent chacune deux ? Comment les différents substrats sont-ils discriminés ? Les enzymes coopèrent-elles entre elles ?

Le deuxième axe de recherche de ma thèse a donc porté sur la compréhension du mode de reconnaissance des transférases Fem pour leurs substrats lipidiques. Nous avons tout d'abord développé des tests cinétiques avec deux méthodes d'analyses complémentaires, qui nous ont permis de déterminer les TO des enzymes pour leurs substrats respectifs. Nous avons ensuite mis au point un test cinétique couplé *in vitro* nous permettant d'étudier la dynamique du système à trois enzymes et cinq substrats mais également d'évaluer l'impact de modifications chimiques introduites dans les substrats lipidiques sur l'activité des transférases Fem. Enfin, la synthèse d'inhibiteurs (analogues de lipides II) nous a permis d'étudier la spécificité étroite de chaque enzyme au niveau de la chaîne latérale et l'impact du changement de la charge à son extrémité. Ces expériences nous ont permis d'obtenir pour la première fois une notion d'affinité des enzymes pour les différentes molécules inhibitrices analogues de lipides et de mieux comprendre la dynamique de synthèse des chainons pentaglycines présents chez *S. aureus*.

1. Hémi-synthèse de substrats lipidiques solubles

Le substrat naturel des transférases Fem est un lipide II comprenant un motif undecaprenyl à 55 carbones (C₅₅). Ce motif rend l'extraction des lipides II naturels très difficile, avec des rendements d'extraction très faibles (quelques nanomoles pour plusieurs litres de culture), et l'extraction nécessite l'utilisation de détergents (Qiao et al., 2017). Au caractère insoluble des lipides II naturels, vient s'ajouter l'impossibilité avec cette méthodologie d'obtenir des lipides II comportant un nombre défini de résidus glycyles au niveau de leur chaîne latérale (obtention majoritaire de lipides II à (Gly)₅ et impossibilité de séparer les différents lipides les uns des autres à partir des bactéries) (**Figure 30A**).

Afin d'étudier les réactions catalysées par ces enzymes, la première étape a donc été de s'affranchir de cette problématique en synthétisant des molécules solubles portant un motif diprényl (C_{10}) et comportant un nombre défini de résidus glycyles au niveau des chaînes latérales (**Figure 30B**). Pour obtenir ces analogues, nous avons utilisé une technique d'hémi-synthèse décrite en détail dans le chapitre matériel et méthode. Cette technique repose sur l'extraction en grande quantité d'UM5K de bactéries, de la fonctionnalisation chimique de la Lys³ de cet UM5K par des résidus glycyles et de l'insertion des motifs C_{10} et du GlcNAc par l'action concertée des enzymes MraY et MurG (**Figure 30C**). Ces molécules présentent l'avantage d'être purifiables par HPLC en grande quantité (plusieurs centaines de nanomoles) en absence de détergent. Nous affranchir de la présence de détergent a été un point important pour notre étude, afin de ne pas introduire de biais dans nos tests cinétiques et de nous permettre d'analyser nos résultats en spectrométrie de masse (LC-MS) de manière directe (sans étape d'élimination).

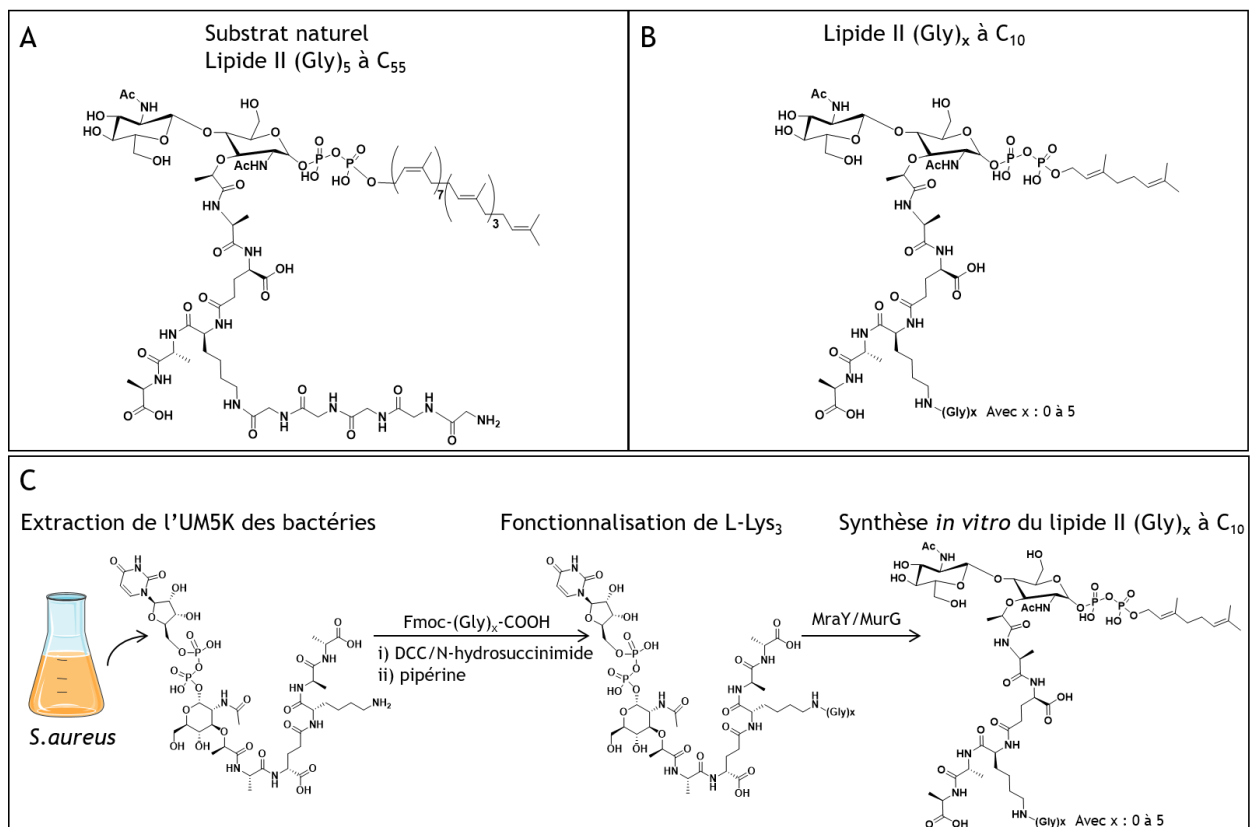


Figure 30 : Hémi-synthèse d'analogues de lipides solubles.

(A) Lipide II naturel à (Gly)₅ possédant un motif undécaprenyl, produit majoritaire d'extraction à partir des bactéries. (B) Analogue de lipide II soluble, portant un nombre défini de glycyles au niveau de la chaîne latérale. (C) Hémi-synthèse des analogues de lipides II solubles portant un motif diprényl et un nombre défini de résidu glycyles.

2. Activité des transférases Fem

Afin d'étudier l'activité des transférases Fem, nous avons réalisé des tests cinétiques (**Figure 31A**) en utilisant deux techniques complémentaires, la radioactivité et la chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS).

L'utilisation de radionucléides nous a permis de suivre au cours du temps le transfert de glycine marquée au carbone 14 ($[^{14}\text{C}]$ -glycine) catalysé par les différentes transférases de la famille Fem. Cette technique permet de quantifier très précisément la quantité de glycine marquée incorporée sur le lipide II. La technique de séparation de la $[^{14}\text{C}]$ -Gly et des lipides radiomarqués formés n'est pas suffisamment résolutive pour séparer des lipides comportant 1 ou 2 glycines (chromatographie sur couche mince : CCM) dans le cas de FemA et FemB qui catalysent deux réactions successives (**Figure 31B**). Nous avons donc mis au point une technique de LC-MS nous permettant cette fois-ci d'identifier et de quantifier les différents produits formés au fil des réactions (**Figure 31C**). L'utilisation combinée de ces deux méthodes nous a permis de déterminer les conditions cinétiques optimales pour étudier les deux réactions de FemA et de FemB découplées l'une de l'autre. Nous sommes partis du postulat que l'ajout de glycines ne devant pas changer la charge nette du substrat lipidique, l'ionisation des différents lipides dans les mélanges réactionnels devrait être comparable. Nous avons décidé de quantifier la concentration de substrat et de produit au cours du temps, en intégrant les intensités des pics m/z (et des adduits sodium) et en calculant les ratios entre les deux espèces. Ces deux techniques indépendantes et complémentaires, nous ont permis d'étudier les réactions des transférases Fem individuellement, d'obtenir les TO de chaque enzyme pour chaque réaction et de les comparer. Les résultats sont présentés sur la **figure 31D**.

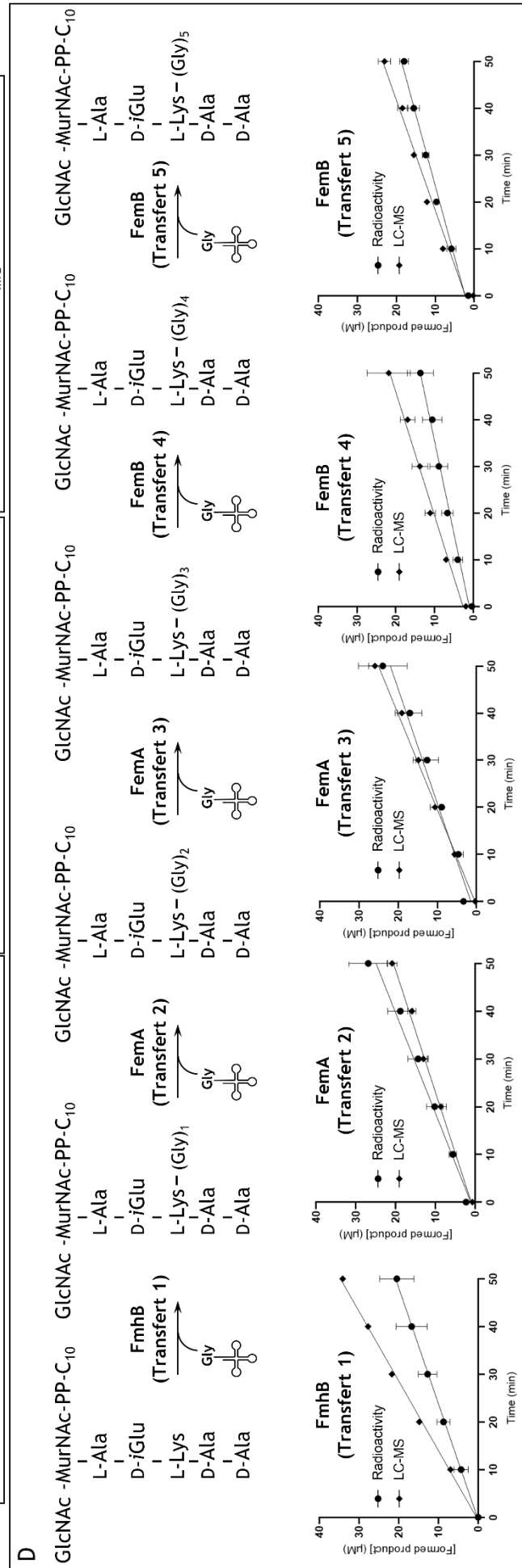
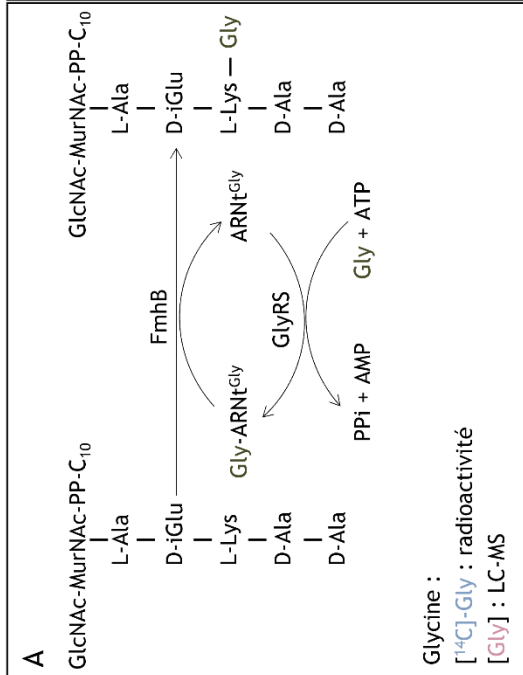
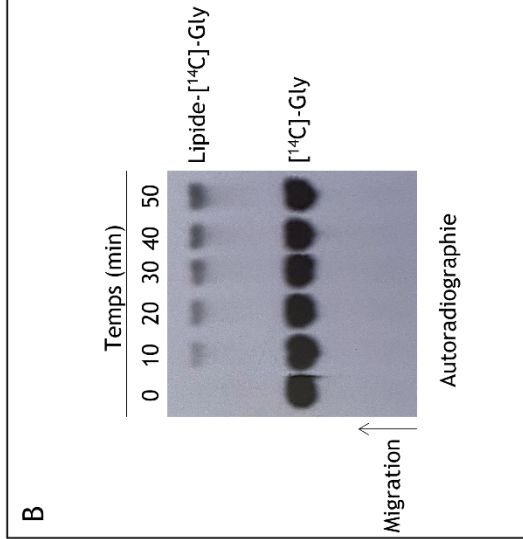
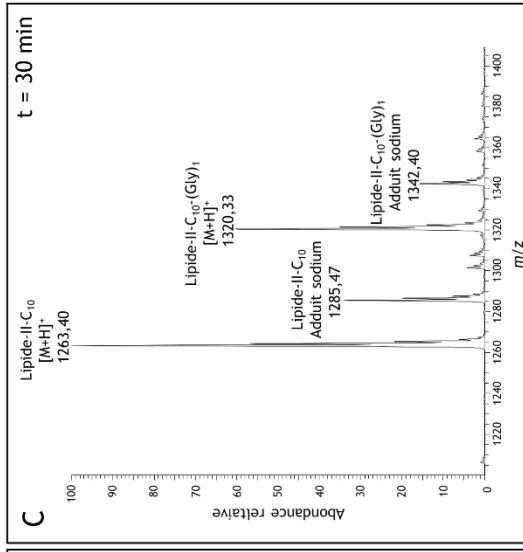


Figure 31 : Turn over des transférases FmhB, FemA et FemB.

(A) Principe du test enzymatique. (B) Exemple d'une autoradiographie obtenue après un test d'activité de FmhB en présence de Glycine radiomarquée au carbone 14. (C) Exemple de chromatogramme de LC-MS obtenu après 30min de réaction avec FmhB. (D) Réactions catalysées par les transférases Fem et déterminations de leurs TO. Toutes les cinétiques ont été réalisées en triplicata.

Nous pouvons observer que l'activité de FmhB présente une certaine variabilité, notamment lors des tests effectués en radioactivité. En effet, les TO obtenus pour les deux techniques sont respectivement de $137 \pm 3 \text{ min}^{-1}$ en LC-MS et de $82 \pm 17 \text{ min}^{-1}$ en radioactivité. Néanmoins la réaction catalysée par FmhB menant à la formation du lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ reste toujours la plus rapide comparée aux réactions catalysées par FemA ou FemB.

FemA qui catalyse ensuite l'ajout d'une seconde glycine, présente des activités similaires en radioactivité et en LC-MS. En effet, les courbes présentant l'apparition du produit de réaction, le lipide II-C₁₀-(Gly)₂, se superposent quasiment pour les deux techniques et les TO obtenus sont respectivement de $3,9 \pm 0,1$ et $4,7 \pm 0,4 \text{ min}^{-1}$ pour la LC-MS et la radioactivité. Les résultats des tests de radioactivité et de LC-MS coïncident également pour la seconde réaction de FemA (transfert 3) avec des TO de $2,5 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ en LC-MS et de $2,1 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$ en radioactivité.

L'étude de FemB nous a permis de démontrer que sa première réaction menant à la formation du lipide-II-C₁₀-(Gly)₄ (transfert 4) est la plus rapide après celle catalysée par FmhB. Les résultats obtenus en LC-MS et en radioactivité sont similaires avec des valeurs de TO respectives de 15 ± 1 et $10 \pm 1 \text{ min}^{-1}$. Les résultats obtenus avec les deux techniques indépendantes concordent également pour sa seconde réaction (transfert 5) avec des TO de $2,1 \pm 0,1$ et $1,7 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$ pour la LC-MS et la radioactivité.

Les rapports entre les TO obtenus avec les expériences de LC-MS et de radioactivité ont ensuite été calculés (fold change), et les valeurs sont indiquées dans le **tableau 2**. Nous pouvons observer que pour toutes les réactions étudiées, les valeurs des fold change sont autour de 1 n'indiquant pas de différences significatives entre les valeurs obtenues en LC-MS et en radioactivité. Nous avons ainsi mis en évidence que la méthode que nous avons développée en LC-MS est non seulement qualitative, mais nous permet également de calculer de manière robuste la concentration des différents produits de réactions des transférases Fem apparaissant au cours du temps.

Transférase Fem	Fem turn over (min^{-1})		Fold change
	LC-MS	Radioactivité	
FmhB Transfert 1	137 \pm 3	82 \pm 17	1,7 \pm 0,4
FemA Transfert 2	3,9 \pm 0,1	4,7 \pm 0,4	0,8 \pm 0,1
FemA Transfert 3	2,5 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1
FemB Transfert 4	15 \pm 1	10 \pm 1	1,5 \pm 0,2
FemB Transfert 5	2,1 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1

Tableau 2 : Turn over des enzymes pour les substrats lipidiques à diprenyl.

3. Dynamique *in vitro* des transférases Fem

Afin de mieux comprendre la dynamique des transférases Fem et d'obtenir les constantes catalytiques des enzymes nommées $k_{n \text{ app}}$, nous avons mis au point un test enzymatique couplé comprenant l'ensemble des transférases Fem en présence de l'analogue de substrat de FmhB (lipide II C₁₀) permettant ainsi la synthèse complète du motif pentaglycine. L'apparition des différents intermédiaires lipidiques au cours du temps a été suivie grâce à la technique de LC-MS. Les données obtenues ont permis de modéliser la dynamique du système avec le logiciel COPASI et de déterminer les différentes constantes catalytiques $k_{n \text{ app}}$. Dans le test cinétique couplé, la concentration d'ARNt^{Gly} a été choisie de façon à être en condition saturante (largement supérieure à son Km estimé à 0.05 μM (Rietmeyer et al., 2021)) et est largement supérieure à la somme des concentrations des enzymes pour éviter tout biais induit par la séquestration du substrat Gly-ARNt^{Gly} par une ou plusieurs des transférases présentes dans le test enzymatique.

Les résultats expérimentaux de la cinétique sont représentés par les symboles et les concentrations théoriques des différentes espèces calculées à partir des $k_{n \text{ app}}$ du modèle sont données par les lignes pointillées (**Figure 32**). Nous pouvons observer que les concentrations modélisées se superposent parfaitement aux données expérimentales, nous permettant de valider le modèle choisi.

Nous avons montré que le substrat initial, le lipide-II-C₁₀ est totalement consommé après 60min de réaction et que la réaction de FmhB est la plus rapide de la chaîne de réaction (confirmant les résultats précédents) avec un $k_{1 \text{ app}}$ de 7,0 \pm 0,3 $\mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$. Le lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ ainsi synthétisé, est consommé par FemA progressivement durant toute la réaction avec un $k_{2 \text{ app}}$ de 0,037 \pm 0,003 $\mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$ afin de former le lipide-II-C₁₀-(Gly)₂ avec un $k_{3 \text{ app}}$ de 0,012 \pm 0,001 $\mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$ qui s'accumule et

atteint un plateau à 30 μ M de 100 à 220min puis décroît jusqu'à la fin de la cinétique. Étonnemment le second substrat de FemA, le lipide-II-C₁₀-(Gly)₃ n'est quasiment pas détecté tout au long de la réaction. Il semblerait que cet intermédiaire lipidique soit lentement synthétisé et/ou rapidement pris en charge par FemB ($k_{4 \text{ app}}$ de $0,077 \pm 0,004 \mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$) qui le convertit en lipide-II-C₁₀-(Gly)₄. Pour finir, FemB catalyse le transfert de la dernière glycine avec un $k_{5 \text{ app}}$ de $0,017 \pm 0,001 \mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$ et permet la formation du produit final de la chaîne de réaction, le lipide-II-C₁₀-(Gly)₅ qui atteint une concentration de 30 μ M après 340min de cinétique (**Figure 32**). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus précédemment lors des cinétiques enzymatiques découplées, confirmant bien que les réactions les plus rapides sont celles de FmhB et la première de FemB.

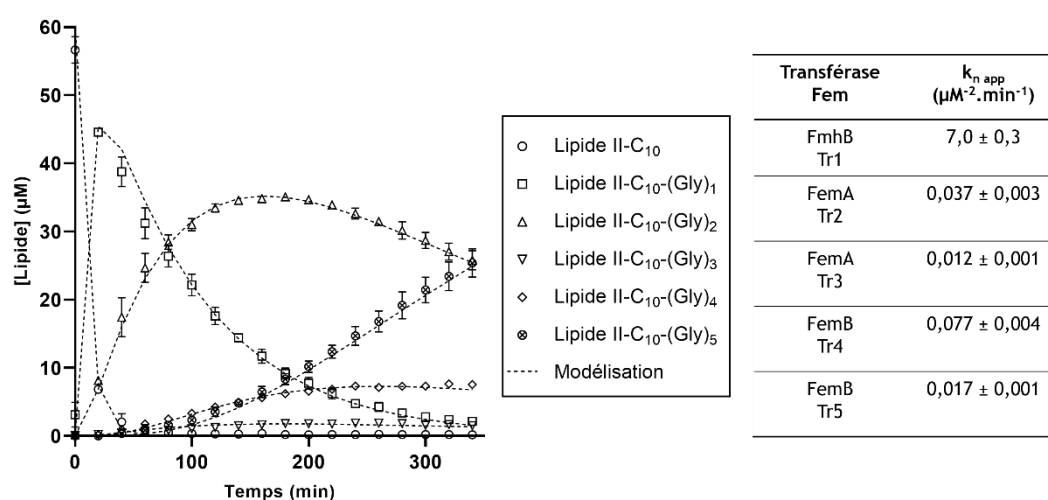


Figure 32 : Test enzymatique couplé avec FmhB, FemA et FemB.

Les données expérimentales (duplicata) sont représentées par les symboles tandis que les données de modélisation sont données par les lignes pointillées. Tr : transfert. Le transfert 1 correspond à la réaction catalysée par FmhB, les 2 et 3 ou 4 et 5 correspondent respectivement aux réactions catalysées par FemA ou FemB.

Impact de l'amidation du résidu D-iGlu² porté par le lipide II sur la dynamique des transférases Fem

Le PG à la surface de *S. aureus* est caractérisé par l'amidation quasiment complète de tous les résidus D-iGlu² de la tige pentapeptidique de ces sous-unités (Leisico et al., 2018). Les mutants déficients pour le processus d'amidation présentent un phénotype caractérisé par une réduction de la sensibilité aux β -lactamines, une réduction de la vitesse de croissance ainsi qu'une sensibilité augmentée à la dégradation du PG par le lysozyme (introduction sous partie 2.3.2). Bien que les études menées aient permis d'identifier le complexe enzymatique MurT/GatD responsable de l'amidation des résidus D-iGlu², aucune information n'est disponible sur l'étape à laquelle agit le complexe ni sur

l'impact de l'amidation sur les transférases Fem. L'activité enzymatique du complexe n'a pas été déterminée, et les seules données publiées indiquent que le complexe de *S. aureus* est capable d'amider le lipide-I-C₅₅, lipide-II-C₅₅ et le lipide-II-(Gly)₅-C₅₅ sur leur résidu D-iGlu², semblant indiquer que le complexe agit à l'étape de synthèse des précurseurs lipidiques du PG (Münch et al., 2012).

Nous nous sommes donc intéressés à l'activité des transférases Fem en présence d'analogues de substrats lipidiques amidés sur leur résidus D-iGlu². Le lipide-II-C₁₀ amidé a été synthétisé puis le test enzymatique couplé décrit ci-dessus a de nouveau été réalisé en utilisant cette molécule comme substrat initial. Les données ont été modélisées avec COPASI afin d'obtenir les $k'_{n\text{ app}}$. Les conditions cinétiques choisies étant strictement identiques à celles obtenues pour le substrat non amidé nous avons comparé le $k_{n\text{ app}}$ et le $k'_{n\text{ app}}$ des deux expériences pour quantifier l'impact de l'amidation sur les différentes réactions enzymatiques catalysées par les transférases Fem.

Nous pouvons observer que la dynamique de synthèse et de consommation des différents intermédiaires lipidiques est assez différente lorsque le substrat initial est amidé. Il est important de noter que la modélisation par COPASI ne permet pas d'obtenir un modèle en parfaite adéquation avec les données expérimentales notamment pour les concentrations des lipide-II-C₁₀-(Gly)₂ et (Gly)₅. Les paramètres cinétique $k'_{n\text{ app}}$ sont donc à considérer avec plus de prudence que précédemment. Cette difficulté à obtenir un modèle concordant avec les données expérimentales peut être due à un problème technique ou à un ou des phénomènes biologiques que ne nous ne sommes pas en mesure de modéliser dans le système choisi (coopérativité entre enzymes, inhibitions des enzymes par certains intermédiaires réactionnels etc..)

Néanmoins, nous pouvons observer que le lipide-II-C₁₀ amidé semble être pris en charge par FmhB beaucoup plus lentement avec un $k'_{1\text{ app}}$ de $1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$ et disparaît totalement après 140min de réaction (vs 60 min pour un substrat non amidé). Le produit de réaction de FmhB, le lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ amidé, atteint 10 μM à son maximum puis est totalement consommé afin de synthétiser les autres intermédiaires lipidiques. Il est utilisé par FemA, qui ajoute une seconde glycine et permet la formation du lipide-II-C₁₀-(Gly)₂ amidé avec un $k'_{2\text{ app}}$ estimé à $0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$. FemA catalyse ensuite sa seconde réaction afin de former le lipide-II-C₁₀-(Gly)₃ amidé avec un $k'_{3\text{ app}}$ de $0,023 \pm 0,001 \mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$, et le produit de réaction n'est toujours quasiment pas détecté comme observé précédemment. FemB synthétise ensuite le lipide-II-C₁₀-(Gly)₄ amidé qui n'est lui aussi que très peu détecté avec un $k'_{4\text{ app}}$ calculé de $0,20 \pm 0,01 \mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$. Enfin, le lipide-II-C₁₀-(Gly)₅ amidé est synthétisé par FemB avec un $k'_{5\text{ app}}$ de $0,063 \pm 0,003 \mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$ jusqu'à atteindre une concentration finale de 50 μM à la fin de la cinétique (**Figure 33**).

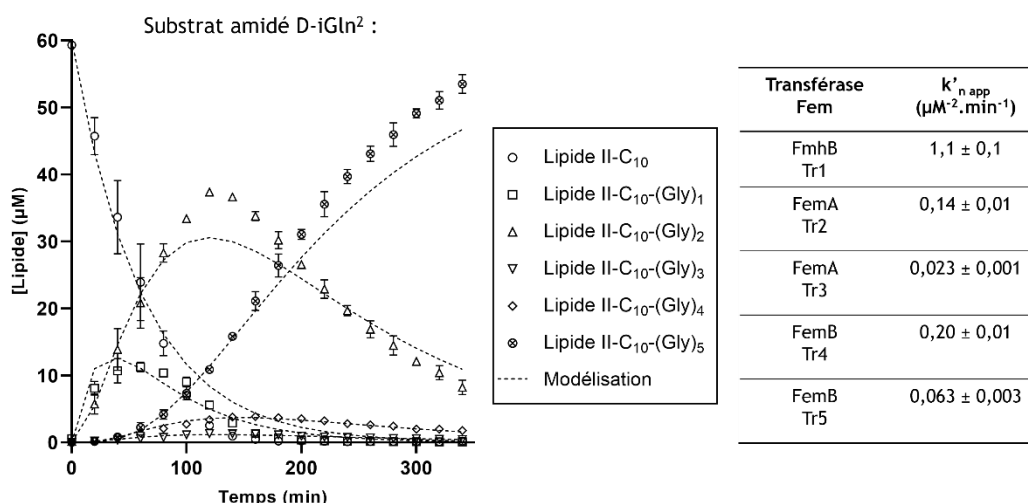


Figure 33 : Test enzymatique couplé avec FmhB, FemA et FemB avec un substrat amidé.

Les données expérimentales sont représentées par les symboles tandis que les données de modélisation sont données par les lignes pointillées. Tr : transfert. Le transfert 1 correspond à la réaction catalysée par FmhB, les 2 et 3 ou 4 et 5 correspondent respectivement aux réactions catalysées par FemA ou FemB.

Pour chaque constante cinétique, le rapport entre $k'_{n\text{ app}}/k_{n\text{ app}}$ (D-iGln²/D-iGlu²) a été calculé et appelé « fold change ». Une valeur inférieure à 1 (seuil indiqué par la ligne pointillée rouge) indique un impact négatif de l'amidation sur l'activité de l'enzyme, tandis que toute valeur supérieure à 1 indique un effet positif de l'amidation. Le « fold change » calculé pour FmhB ($0,2 \pm 0,02$) indique que l'amidation a un impact négatif sur la réaction catalysée par FmhB. Les « fold change » obtenus pour FemA ($3,9 \pm 0,4$ et $1,9 \pm 0,1$) et FemB ($2,6 \pm 0,2$ et $3,7 \pm 0,3$) présentent des valeurs supérieures à 1, indiquant que toutes les réactions de FemA et de FemB sont accélérées en présence de substrats amidés (**Figure 34**).

Test couplé FmhB, FemA et FemB

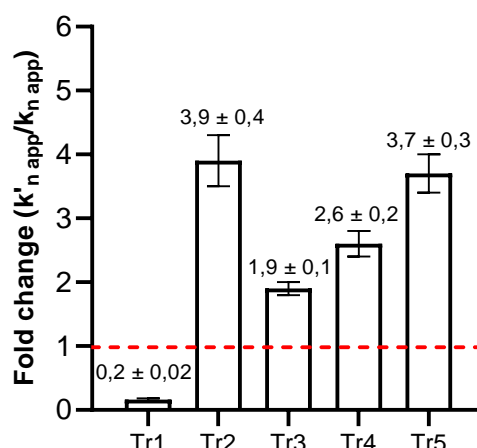


Figure 34 : « Fold change » calculés présentant l'impact de l'amidation des substrats sur les enzymes lors du test couplé.

Tr : transfert. Le transfert 1 correspond à la réaction catalysée par FmhB, les 2 et 3 ou 4 et 5 correspondent respectivement aux réactions catalysées par FemA ou FemB.

4. Impact de l'amidation sur l'activité de chaque enzyme

Afin d'aller plus loin nous avons décidé d'étudier l'impact de l'amidation sur les enzymes de manière découplée. Pour cela, des analogues de substrats lipidiques amidés possédant 0, 1 ou 3 glycines ont été synthétisés et testés comme substrats de FmhB, de FemA ou de FemB. Les cinétiques avec les substrats amidés et non amidés ont été réalisées dans les mêmes conditions enzymatiques afin d'évaluer l'impact de l'amidation sur l'activité de chaque transférase indépendamment des deux autres.

4.1. FmhB

Les résultats obtenus pour FmhB sont présentés sur la **Figure 35**. Nous pouvons observer que dans le contexte du substrat non amidé la réaction est plus rapide avec un $k_{1\text{ app}}$ de $1,9 \pm 0,3 \mu\text{M}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$, et la concentration du lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ atteint un plateau à environ 45 μM après 240min de cinétique (**Figure 35A**). En revanche, lorsque le substrat de FmhB est amidé et porte un D-iGln², seule la moitié du substrat est consommée à la fin de la cinétique et la concentration de produit n'atteint donc que 30 μM (**Figure 35B**). Dans ce contexte l'enzyme possède désormais un $k'_{1\text{ app}}$ de $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$. Le « fold change » calculé à partir des $k_{1\text{ app}}$ obtenus est de $0,31 \pm 0,07$ et confirme bien l'impact négatif de l'amidation sur FmhB (**Figure 35C**).

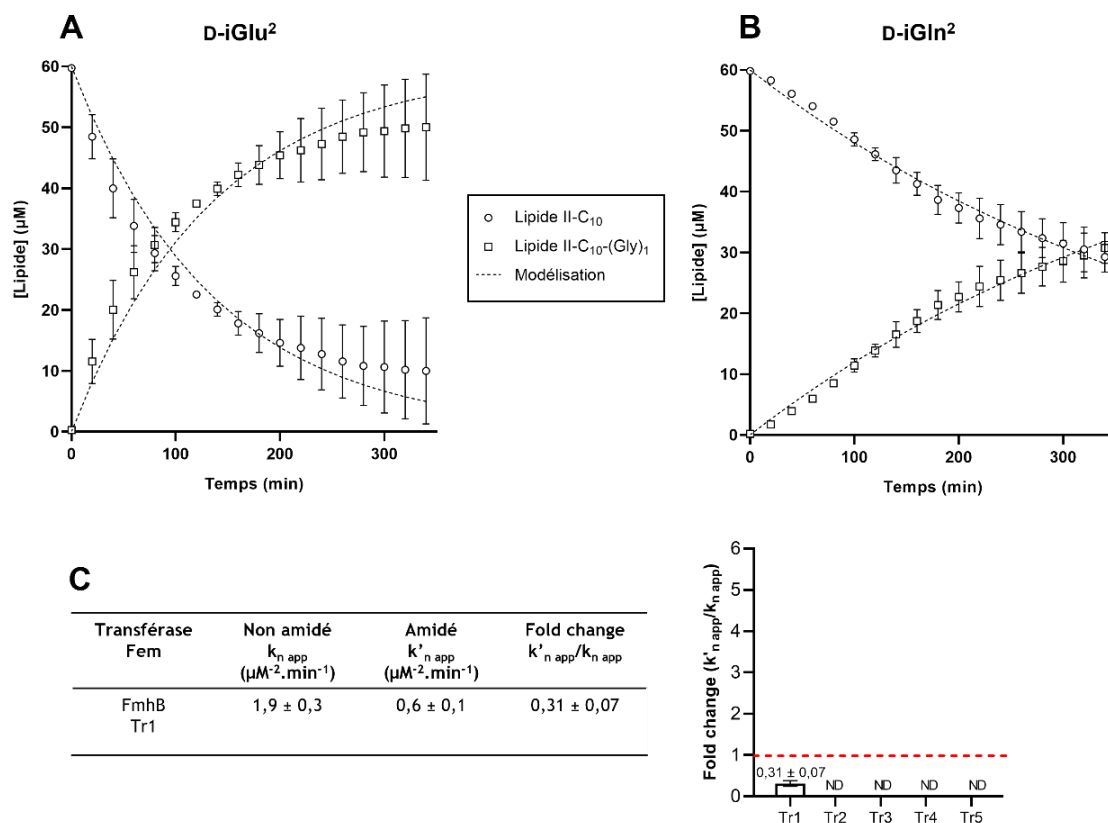


Figure 35 : Impact de l'amidation sur la réaction catalysée par FmhB.

Cinétique enzymatique obtenue avec (A) le substrat non amidé (D-iGlu²) et (B) le substrat amidé (D-iGln²). (C) $k_{1\ app}$ et $k'_{1\ app}$ obtenus pour les deux cinétiques et représentation graphique du « fold change » calculé pour le $k_{1\ app}$ (ND : non défini). Garder la même échelle

4.2. FemA

L'impact de l'amidation des substrats a également été testé sur FemA (Figure 36). Nous pouvons observer que seuls les 2/3 du lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ non amidé ont été utilisés par FemA à la fin de la cinétique avec un $k_{2\ app}$ de $0,09 \pm 0,01 \mu\text{M}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ (Figure 36A et 36C) alors que lorsque le substrat est amidé il est totalement consommé après 200min de réaction avec un $k'_{2\ app}$ de $0,31 \pm 0,05 \mu\text{M}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ (Figure 36B et 36C). Le « fold change » calculé ($k'_{2\ app}/k_{2\ app}$) est de $3,5 \pm 0,7$ indiquant que la vitesse de la première réaction de FemA est plus importante en présence d'un substrat amidé (Figure 36C). Le lipide-II-C₁₀-(Gly)₂ formé est ensuite pris en charge par FemA qui catalyse alors sa seconde réaction et permet la formation du lipide-II-C₁₀-(Gly)₃. La concentration de lipide-II-C₁₀-(Gly)₂ non amidé synthétisé atteint un plateau après 220min de réaction puis est converti en lipide-II-C₁₀-(Gly)₃ par FemA avec un $k_{3\ app}$ de $0,029 \pm 0,003 \mu\text{M}^2 \cdot \text{min}^{-1}$. Le produit atteint une concentration finale de $10\mu\text{M}$ (Figure 36A et 36C). Lorsque le substrat est amidé, la conversion du lipide-II-C₁₀-(Gly)₂ en lipide-II-C₁₀-(Gly)₃ est catalysée par FemA avec un $k'_{3\ app}$ de $0,055 \pm 0,005 \mu\text{M}^2 \cdot \text{min}^{-1}$ et la concentration de produit atteint

30 μ M (Figure 35B et 35C). Le « fold change » calculé pour cette seconde réaction ($k'_{3\text{ app}} / k_{3\text{ app}}$) est de $1,9 \pm 0,3$ indiquant que la réaction est 1,9 fois plus rapide lorsque le substrat est amidé (Figure 36C). Ces résultats confirment que FemA utilise bien de manière plus efficace ses deux substrats lorsqu'ils sont amidés.

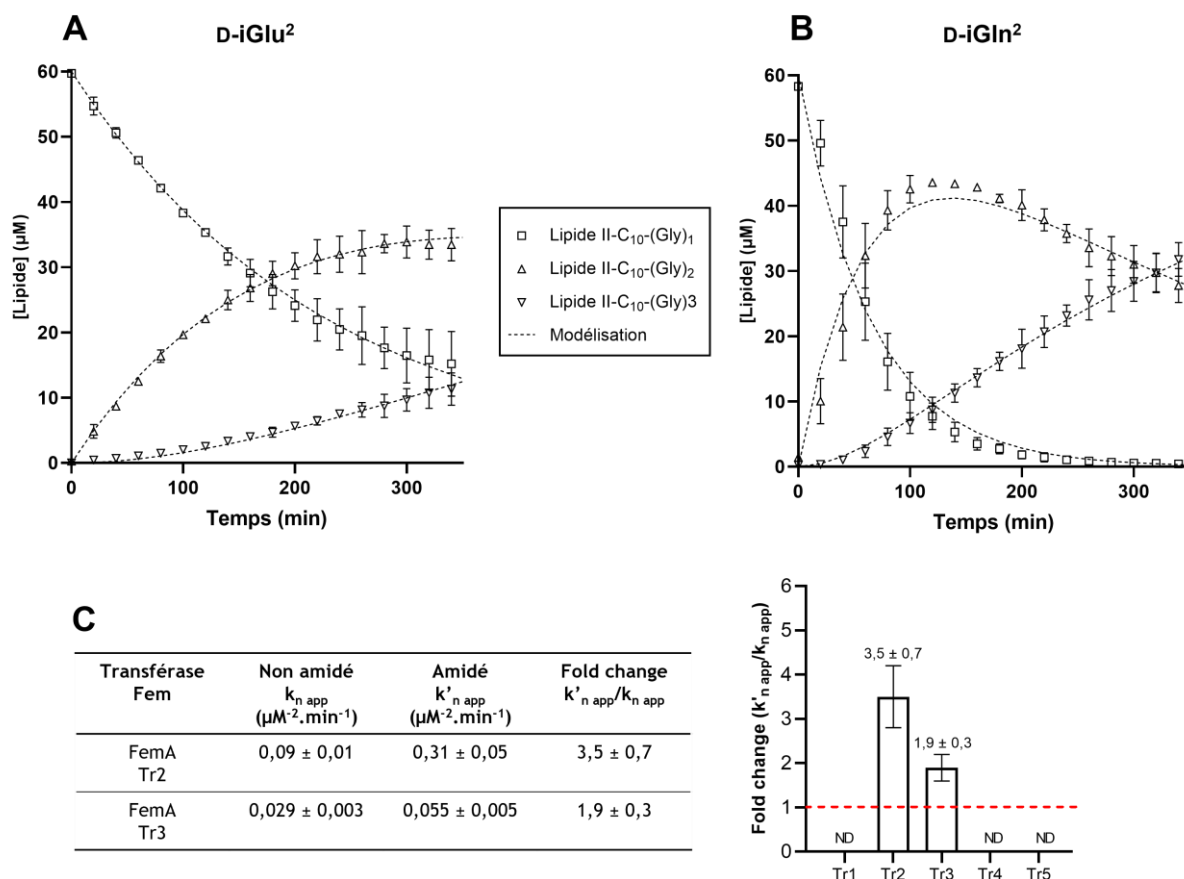


Figure 36 : Impact de l'amidation sur les deux réactions catalysées par FemA.

Cinétique enzymatique obtenue avec (A) le substrat non amidé (D-iGlu²) et (B) le substrat amidé (D-iGln²). (C) k_{app} et k'_{app} obtenus et représentation graphique des « fold change » calculés pour les constantes catalytiques des transferts 2 et 3 (Tr2 et Tr3) catalysés par FemA (ND : non défini).

4.3. FemB

L'impact de l'amidation sur l'activité de FemB a également été évalué (Figure 37). Dans un contexte non amidé, le lipide-II-C₁₀-(Gly)₃ est convertit en lipide-II-C₁₀-(Gly)₄ par FemB avec un $k_{4\text{ app}}$ de $0,68 \pm 0,02 \mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$ et sa concentration est négligeable après 120min de cinétique (Figure 37A et 36C). Lorsque le substrat est amidé, le lipide-II-C₁₀-(Gly)₃ est totalement consommé après 80min de réaction et la constante cinétique $k'_{4\text{ app}}$ calculée est de $1,2 \pm 0,3 \mu\text{M}^{-2}.\text{min}^{-1}$ (Figure 37B et 37C) ce qui donne un rapport $k'_{4\text{ app}}/k_{4\text{ app}}$ (fold change) de $1,7 \pm 0,4$ (Figure 37C). Une différence plus marquée a été observée pour la seconde réaction catalysée par FemB. Lorsque le substrat n'est pas amidé, le

lipide-II-C₁₀-(Gly)₄ (premier produit de FemB) est rapidement synthétisé pour être ensuite lentement converti en lipide-II-C₁₀-(Gly)₅ (second produit de FemB) jusqu'à atteindre une concentration finale de 20μM. Le $k_{5\text{ app}}$ calculé est de $0,031 \pm 0,002 \mu\text{M}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figure 37A et 37C). En comparaison, lorsque le substrat est amidé, il est consommé plus rapidement par FemB ($k'_{5\text{ app}}$ de $0,15 \pm 0,02 \mu\text{M}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$) pour former le lipide-II-C₁₀-(Gly)₅ qui atteint une concentration finale de 50μM (Figure 37B et 37C). Le fold change calculé ($k'_{5\text{ app}}/k_{5\text{ app}}$) est alors de $4,8 \pm 0,6$ (Figure 37C). Nous avons montré que l'amidation a un impact positif sur l'activité des deux réactions catalysées par FemB.

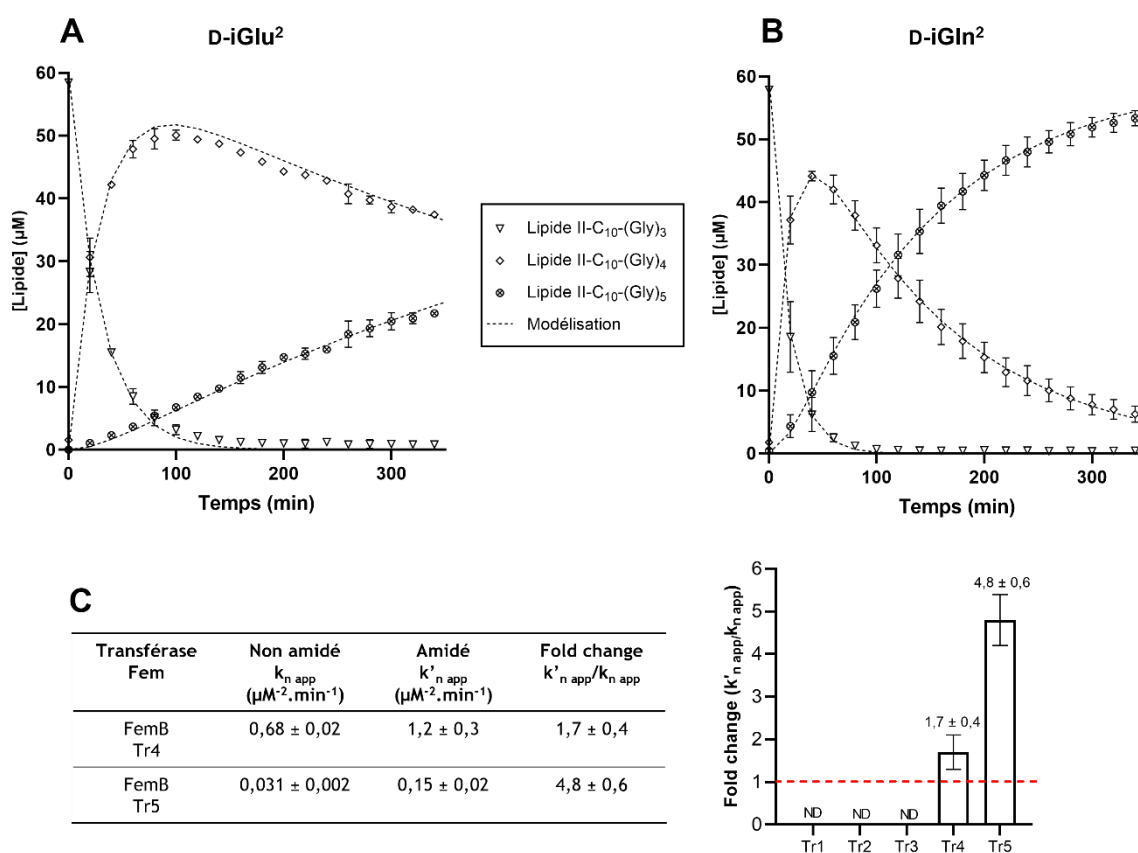


Figure 37 : Impact de l'amidation sur les deux réactions catalysées par FemB.

Cinétique enzymatique obtenue avec (A) le substrat non amidé (D-iGlu²) et (B) le substrat amidé (D-iGln²). (C) k_{app} et k'_{app} obtenus et représentation graphique des « fold change » calculés pour les constantes catalytiques des transferts 4 et 5 (Tr4 et Tr5) catalysés par FemB (ND : non défini).

5. Coopérativité des transférases Fem

Il a été montré que les enzymes FemA et FemB peuvent former des homo- ou des hétéro-dimères (Rohrer and Berger-Bächi, 2003). Le rôle de la formation de ces dimères n'est pas encore connu. Une des hypothèses proposée dans cette étude serait que l'association de FemA et de FemB pourrait améliorer la catalyse de leurs réactions (coopérativité). Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons réalisé un test enzymatique couplé en LC-MS comprenant FemB seule ou en présence équimolaire de FemA, et le lipide-II-C₁₀-(Gly)₃ à D-iGlu² (substrat de FemB exclusivement). En comparant les constantes cinétiques obtenues lors de ces deux expériences indépendantes, nous pouvons savoir si la présence de FemA permet d'accélérer les réactions catalysées par FemB *in vitro*. Les résultats sont présentés sur la **Figure 38**. Les constantes catalytiques calculées pour FemB en présence de FemA ont été nommées $k''_{n\text{ app}}$.

En présence ou en absence de FemA, les synthèses du lipide-II-C₁₀-(Gly)₄ ou (Gly)₅ catalysées par FemB sont similaires (**Figure 38**). Les constantes catalytiques obtenues sont respectivement de 0,73 $\mu\text{M}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ pour le $k''_{4\text{ app}}$ et de 0,036 $\mu\text{M}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ pour le $k''_{5\text{ app}}$. Ces constantes catalytiques ne sont donc significativement pas différentes de celles obtenues en absence de FemA ($k_{4\text{ app}}$ 0,68 \pm 0,02 $\mu\text{M}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ et $k_{5\text{ app}}$ de 0,031 \pm 0,002 $\mu\text{M}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$). Ces résultats préliminaires ne semblent donc pas indiquer de coopérativité entre FemA et FemB en ce qui concerne les réactions catalysées par FemB dans un contexte non amidé.

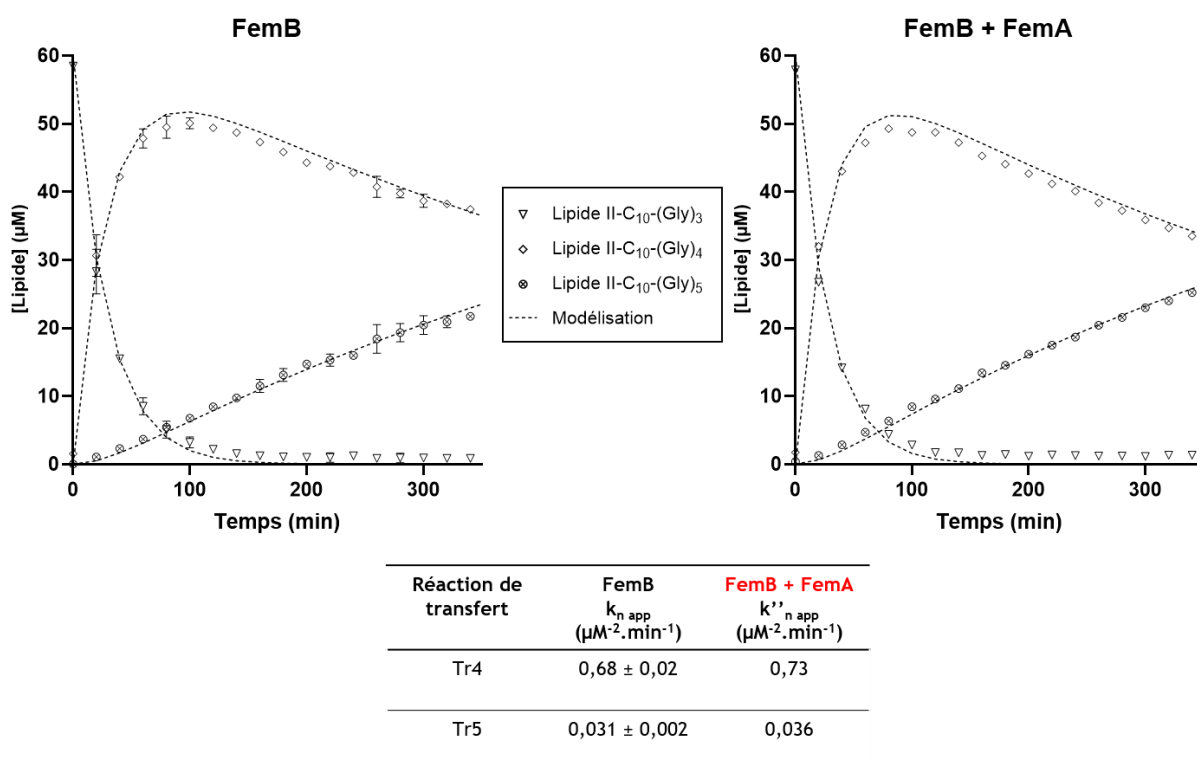


Figure 38 : Pas de coopérativité entre FemB et FemA.

Pour l'expérience de coopérativité $n=1$ et ne nous permet pas de représenter les déviations standards. Les $k_{n \text{ app}}$ obtenus pour les réactions catalysées par FemB en absence de FemA ont été repris de la Figure 36.

6. Inhibition de FmhB par les différents intermédiaires lipidiques

Chez *S. aureus*, la quasi-totalité du PG mature trouvé à la surface de la bactérie est amidé et est branché via des chaînes latérales pentaglycine. De façon à comprendre les mécanismes de régulation de la synthèse du chaînon pentaglycine et de l'amidation du résidu D-iGlu², nous nous sommes intéressés à l'affinité des enzymes pour les différents substrats lipidiques. En effet, tous les intermédiaires formés durant la synthèse des précurseurs lipidiques sont structurellement proches et pourraient éventuellement présenter des capacités d'inhibition des transférases Fem. Afin de tester cette hypothèse, nous avons dans un premier temps testé les lipides-II-C₁₀ comportant 1, 3 ou 5 résidus glycoles au niveau de leurs chaînes latérales comme inhibiteurs de FmhB.

Le principe du test d'inhibition de FmhB est présenté sur la **figure 39**. Brièvement, des concentrations croissantes de l'inhibiteur ont été ajoutées dans un mix réactionnel à pH 7,5 comprenant FmhB (5nM), le lipide-II-C₁₀ (60 μ M), l'ARNt NP2 (0,4 μ M), de la glycine radiomarquée [¹⁴C]-Gly (60 μ M), la glycyI-ARNt-synthétase (0,8 μ M) en très large excès pour assurer un pool d'ARNt aminoacylé constant et de l'ATP (7,5mM). Après 40min d'incubation à 30°C, la glycine radiomarquée

et le produit final de réaction ont été séparés par CCM, et les spots de radioactivité ont été détectés par autoradiographie. La concentration de produit final, en présence des différentes concentrations de l'inhibiteur, a été détectée par comptage de ces spots par scintillation liquide.

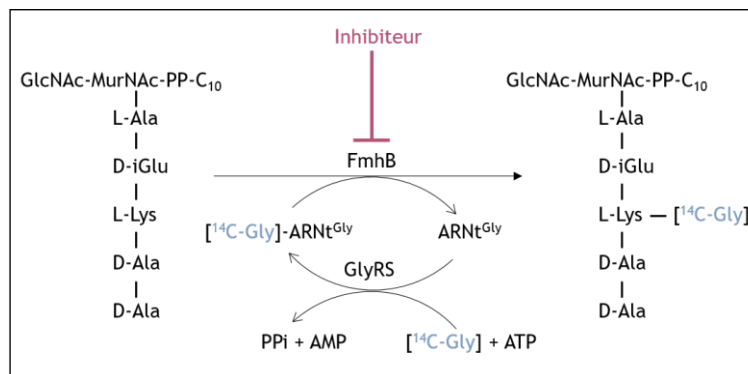


Figure 39 : Test d'inhibition de FmhB.

En ce qui concerne les résultats, aucune inhibition de FmhB n'a été détectée en présence de lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ et de lipide-II-C₁₀-(Gly)₃. En revanche, le lipide-II-C₁₀-(Gly)₅ a montré une capacité d'inhibition importante de FmhB, avec une constante d'inhibition calculée de $7,4 \pm 0,6 \mu\text{M}$ (**Figure 40**).

Afin d'évaluer l'impact de l'amidation sur les capacités d'inhibition du lipide à chaîne latérale pentaglycine, le lipide-II-C₁₀-(Gly)₅ amidé a également été testé comme inhibiteur ($K_i = 45,9 \pm 12,5 \mu\text{M}$, **Figure 40**). Cette molécule inhibe donc FmhB avec une efficacité diminuée d'un facteur 6,2, semblant indiquer que la diminution d'activité de FmhB détectée en présence du lipide-II-C₁₀ amidé est liée à la moins bonne affinité de l'enzyme pour ce substrat.

Ces résultats nous permettent de conclure que (i) l'amidation joue un rôle dans le contrôle de la réaction de FmhB par le lipide-II-C₁₀-(Gly)₅ et que (ii) le lipide-II-C₁₀-(Gly)₅ (non amidé) peut entrer en compétition de manière efficace avec le substrat de FmhB exerçant ainsi une activité de « rétrocontrôle » sur la synthèse des autres intermédiaires de la chaîne réactionnelle. L'inhibition de FmhB par le produit final de réaction non amidé, pourrait être une manière pour *S. aureus* de moduler la voie de biosynthèse des précurseurs lipidiques du PG, afin que la totalité des précurseurs soient amidés avant d'être exportés à la surface de la bactérie.

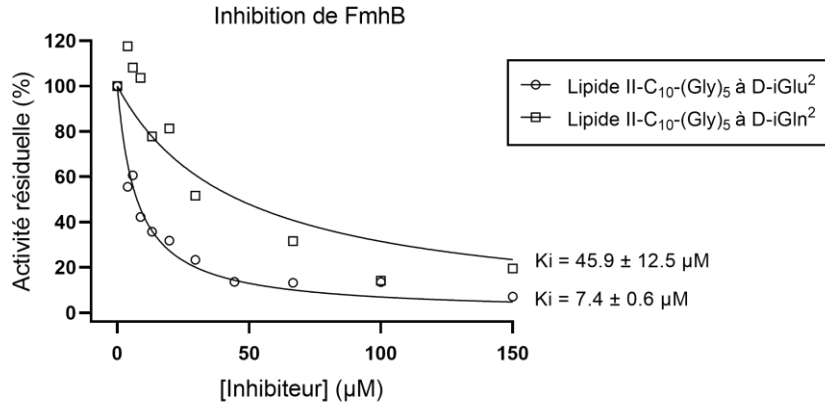


Figure 40 : Inhibition de FmhB par le lipide-II-C₁₀-(Gly)₅ à D-iGlu² ou D-iGln².

Dans le but d'étudier de manière plus étroite la spécificité de substrat des transférases Fem au niveau de la chaîne latérale des lipides, nous avons synthétisé des inhibiteurs (analogues de lipides II à C₁₀) comportant des groupements glycol ou malonate en position terminale de la chaîne latérale. L'insertion de ces modifications a été rendue possible par l'utilisation de la technique d'hémi-synthèse décrite plus haut. Les molécules synthétisées présentent l'avantage d'être des analogues structuraux non réactifs des différents substrats, et elles nous ont permis d'étudier l'impact du changement de la longueur et de la charge de la chaîne latérale sur l'affinité des différentes transférases Fem. Les composés synthétisés possèdent 0, 1, 2, 3 ou 4 glycines et un groupement glycol ou un groupement malonate à l'extrémité de leur chaîne latérale (**Figure 41**).

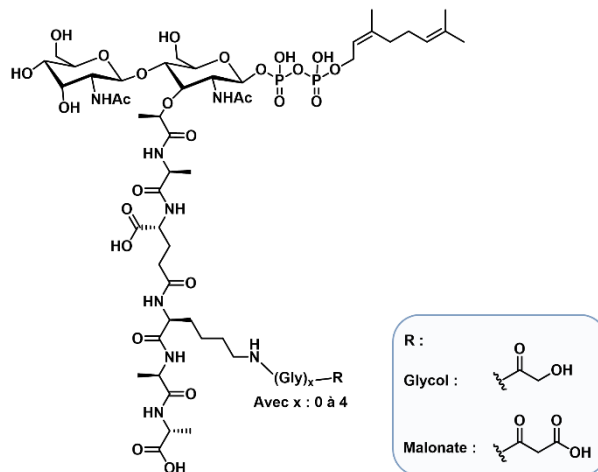


Figure 41 : Structure des inhibiteurs à glycol ou malonate, analogues de lipides à C₁₀.

Inhibiteurs à glycol

Le groupement glycol a été choisi car c'est un analogue structural de la glycine possédant un résidu hydroxyle (OH) à la place de l'amine terminale (NH₂). Les molécules portant ce glycol sont structurellement très proches des substrats lipidiques. Le résidu hydroxyle ne devrait pas provoquer de gêne stérique dans le site catalytique, il est neutre à pH physiologique et peu nucléophile. Une fois les inhibiteurs synthétisés, leurs capacités d'inhibition sur les trois enzymes ont été évaluées lors d'un test enzymatique (décrit **Figure 39**) les faisant entrer en compétition avec les analogues de substrats respectifs des transférases Fem : le lipide II C₁₀ pour FmhB, le lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ pour FemA et enfin le lipide-II-C₁₀-(Gly)₃ pour FemB.

Nous avons montré que FmhB est inhibée par l'ensemble des inhibiteurs de la série à glycol avec des efficacités variables reflétées par des K_i allant du micromolaire à une dizaine de micromolaires. Le lipide II-C₁₀-glycol, analogue du lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ qui est le produit de réaction de FmhB, possède un K_i de $1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Étonnamment, le lipide-II-C₁₀-(Gly)₁-glycol ou le lipide II-C₁₀-(Gly)₂-glycol inhibent FmhB avec des K_i du même ordre de grandeur ($0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$ et $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$) alors qu'ils ne miment ni le substrat ni le produit de réaction de cette enzyme. Nous avons montré que les lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ et le lipide-II-C₁₀-(Gly)₃ ne présentent aucune capacité d'inhibition à une concentration de $15 \mu\text{M}$ ce qui semble indiquer que la substitution de la glycine, chargée positivement à pH physiologique (pK_a = 9,7) par un groupement glycol ayant une charge neutre à ce pH, a un impact positif sur l'inhibition. Cela pourrait indiquer que les lipide-II-C₁₀-(Gly)₁ ou (Gly)₃ sont exclus du site actif de FmhB par un phénomène de répulsion ionique via des résidus chargés positivement de la protéine. Enfin, les lipides-II-C₁₀-(Gly)₃-glycol ou (Gly)₄-glycol ont des constantes d'inhibition respectives plus importantes de $15 \pm 2 \mu\text{M}$ et $11 \pm 1 \mu\text{M}$ (**Figure 42A et Tableau 3**). Concernant le lipide à pentaglycine testé précédemment, il semble que la substitution de l'amine par un alcool n'a pas d'effet significatif sur l'inhibition de FmhB ($7,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$ vs à $11 \pm 1 \mu\text{M}$), semblant indiquer que la protéine ne possède pas de résidu excluant le lipide-II-C₁₀-(Gly)₅ du site actif via des phénomènes de répulsions ioniques.

La série de molécules a également été testée comme inhibiteurs de FemA ou FemB. Seuls les lipide-II-C₁₀-glycol, (Gly)₁-glycol et (Gly)₂-glycol ont montré des capacités d'inhibitions limitées de FemA avec des K_i respectifs de $123 \pm 25 \mu\text{M}$; $148 \pm 24 \mu\text{M}$ et $94 \pm 11 \mu\text{M}$. Ces valeurs sont 100 fois plus élevées que celles obtenues lors du test d'inhibition de FmhB, traduisant une moins bonne affinité de FemA pour ces molécules qui miment pourtant son substrat de départ, son 1^{er} produit qui est aussi son 2nd substrat et son produit final de réaction (**Figure 42B et Tableau 3**). Les lipides-II-C₁₀-(Gly)₃-glycol ou (Gly)₄-glycol pourraient quant-à-eux être exclus du site actif par un encombrement stérique, de par leur chaîne latérale plus longue que celles des substrats ou produits de FemA.

Enfin, nous avons démontré que le meilleur inhibiteur de FemB est le lipide-II-C₁₀-(Gly)₂-glycol, qui est un analogue de son 1^{er} substrat, avec un K_i de 53 ± 5 μM. Le lipide-II-C₁₀-(Gly)₁-glycol a présenté une capacité d'inhibition de FemB limitée et semblable à celle obtenue pour FemA avec un K_i de 139 ± 20 μM. Les inhibiteurs mimant son 2nd substrat (lipide-II-C₁₀-(Gly)₃-glycol) et le produit final de réaction (lipide-II-C₁₀-(Gly)₄-glycol) n'ont présenté de façon surprenante aucune capacité d'inhibition de l'enzyme (**Figure 42C et Tableau 3**). Ne pouvant pas déterminer l'affinité de l'enzyme pour ses substrats possédant une chaîne latérale à 4 ou 5 glycines, nous sommes dans l'impossibilité de déterminer si cette mauvaise affinité est dû au changement de groupement (amine vs alcool).

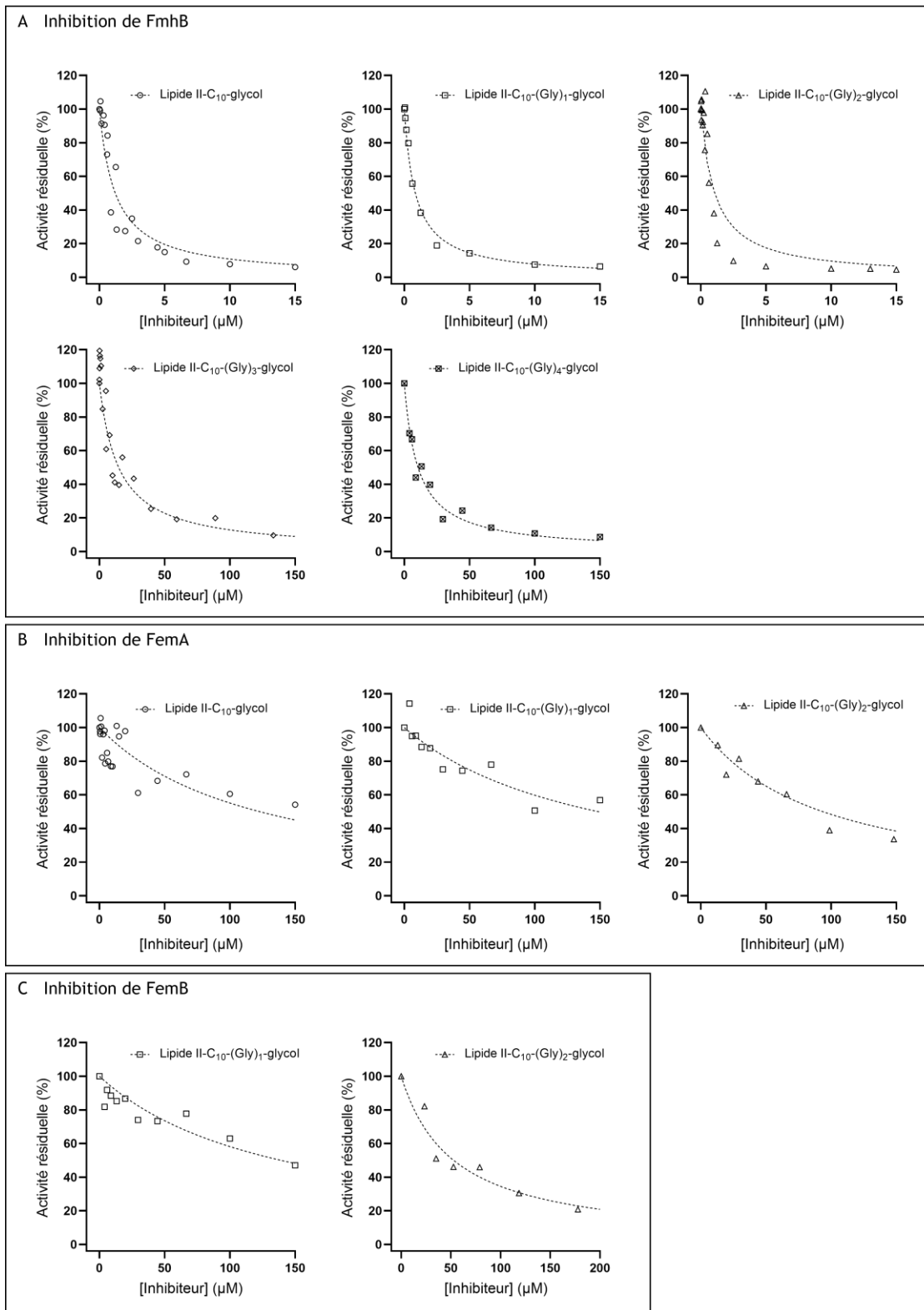


Figure 42 : Inhibition des transférases de la famille Fem de *S. aureus* par les inhibiteurs de la série à glycol.

(A) Inhibition de FmhB. **(B)** Inhibition de Fema. **(C)** Inhibition de FemB.

Analogue lipidique	Inhibition de FmhB Ki (μM)	Inhibition de FemA Ki (μM)	Inhibition de FemB Ki (μM)
Lipide-II-C ₁₀ -glycol	1,2 \pm 0,2	123 \pm 25	ND
Lipide-II-C ₁₀ -(Gly) ₁ -glycol	0,9 \pm 0,1	148 \pm 24	139 \pm 20
Lipide-II-C ₁₀ -(Gly) ₂ -glycol	1,1 \pm 0,2	94 \pm 11	53 \pm 5
Lipide-II-C ₁₀ -(Gly) ₃ -glycol	15 \pm 2	ND	ND
Lipide-II-C ₁₀ -(Gly) ₄ -glycol	11 \pm 1	ND	ND

Tableau 3 : Constantes d'inhibition (Ki) obtenues pour les différentes molécules de la série d'inhibiteurs à glycol.

ND : constante non déterminée, les molécules possèdent un Ki supérieur à 150 μM .

Inhibiteurs à malonate

Afin de tenter d'améliorer les capacités d'inhibition des deux meilleurs inhibiteurs de FmhB, nous avons décidé de synthétiser deux nouvelles molécules possédant cette fois-ci un groupement malonate au lieu d'un groupement glycol à l'extrémité de la chaîne latérale (structure sur la **Figure 41**). L'acide malonique possède un carbone de plus que la glycine, et le NH_2 est remplacé par un groupement acide carboxylique, permettant d'apporter des sites accepteurs de liaisons hydrogènes supplémentaires. Ce groupement est chargé négativement à pH physiologique ($\text{pK}_a = 5,7$) et peut donc former des interactions ioniques. Nous avons ainsi généré les lipide-II-C₁₀-(Gly)₁-malonate et lipide-II-C₁₀-(Gly)₂-malonate et nous les avons testés comme inhibiteurs de FmhB (**Figure 43**).

Les Ki obtenus ont été de 0,7 \pm 0,1 μM pour le lipide-II-C₁₀-(Gly)₁-malonate et de 1,9 \pm 0,3 μM pour le lipide-II-C₁₀-(Gly)₂-malonate. Ces constantes d'inhibition sont similaires à celles obtenues pour les inhibiteurs ayant le groupement glycol n'indiquant aucun effet de la substitution du glycol par un malonate.

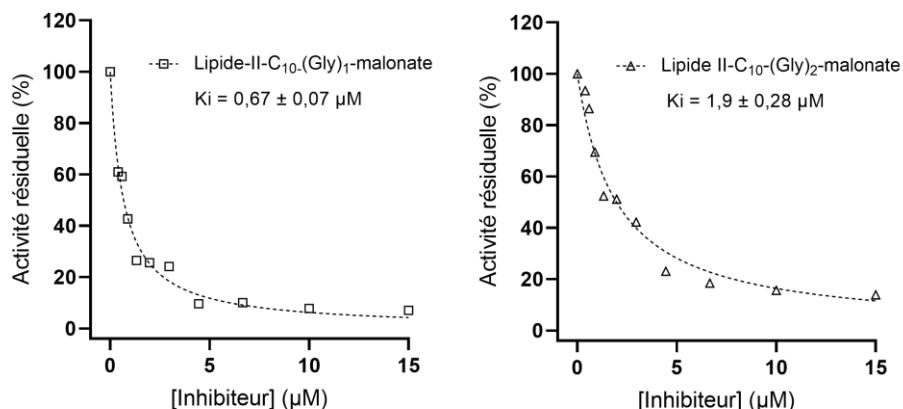


Figure 43 : Inhibition de FmhB par les inhibiteurs possédant un groupement malonate.

Dans ce chapitre, nous avons montré que l'amidation a un impact négatif sur l'activité de FmhB. Afin d'obtenir une notion d'affinité de cette enzyme pour un analogue de lipide amidé, nous avons synthétisé le lipide-II-C₁₀-glycol possédant un résidu D-iGln² au niveau de la tige pentapeptidique et nous l'avons testé comme inhibiteur de FmhB. Nous avons montré que l'inhibiteur avec le résidu D-iGln² présente une capacité d'inhibition diminuée d'un facteur quatre lorsqu'il est comparé avec l'inhibiteur à D-iGlu² (K_i de $4,95 \pm 1,15 \mu\text{M}$ vs $1,2 \pm 0,18 \mu\text{M}$) (**Figure 44**). Ce résultat indique à nouveau que l'amidation a un impact négatif sur l'affinité de FmhB, ce qui explique la diminution d'activité de FmhB pour un substrat amidé comparativement à un substrat non amidé.

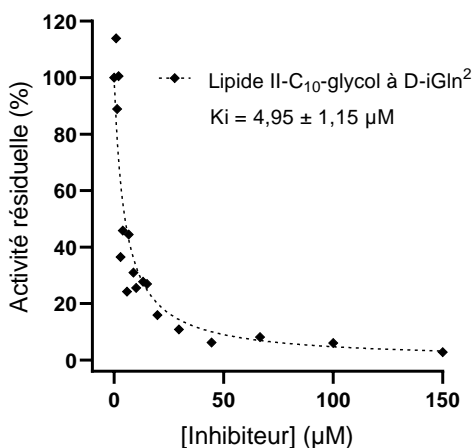


Figure 44 : Inhibition de FmhB par le lipide-II-C₁₀-glycol à D-iGln².

L'analogie de structure entre le lipide-II-C₁₀-glycol amidé et le lipide-II-C₁₀-(Gly)₁, 1^{er} substrat de FemA, nous a permis de tester cette molécule comme inhibiteur de FemA. Nous avons montré que l'inhibiteur possède un K_i de 105 ± 22 μM similaire à celui obtenu avec la molécule à D-iGlu² (123 ± 25 μM). Précédemment nous avons montré que la vitesse de la première réaction de FemA était accélérée d'un facteur 3,5 en présence d'un substrat amidé. L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'affinité de FemA n'est pas modifiée en présence du résidu D-iGln² et que seule sa catalyse est accélérée.

Pour conclure, l'hémi-synthèse d'inhibiteurs nous a permis pour la première fois d'obtenir une notion d'affinité des enzymes pour les différents intermédiaires lipidiques. Nous avons également été en mesure de mieux comprendre et d'expliquer la spécificité et la discrimination des lipides au niveau de leurs chaînes latérales par les transférases Fem. Enfin, l'accès à ce type de molécule analogues de lipides II, possédant des propriétés d'inhibition et inhibant spécifiquement FmhB qui est essentielle pour la viabilité de la bactérie, ouvre la voie au développement de nouvelles molécules antibactériennes.

Pour identifier les déterminants de la protéine contrôlant la spécificité de substrat de FmhB nous avons ensuite entrepris de co-cristalliser FmhB en présence de son substrat lipide-II-C₁₀.

CHAPITRE III : Etude structurale des transférases de la famille Fem.

Afin d'étudier les interactions des Fem transférases avec leurs substrats et d'obtenir des informations structurales, nous avons menés une étude de cristallographie aux rayons X en collaboration avec l'équipe de H. Van Tilbeurgh (I2BC, Université Paris Saclay).

La première structure de transférases Fem de *S. aureus*, a été obtenue pour FemA en 2002 par une autre équipe de recherche à une résolution de 2,1 ångström (Å) (RCSB Protein Data Bank code d'accèsion : 1LRZ) (Benson et al., 2002). Néanmoins cette structure est incomplète et les résidus 209 à 220 sont manquants. Afin d'obtenir une structure de FemA complète et celles des deux autres transférases, un crible a été réalisé avant mon arrivée au laboratoire afin d'identifier les conditions optimales de cristallisation des transférases. Cela a permis à mon équipe d'obtenir plusieurs structures, dont une structure à haute résolution (1,75 Å) de FemA, qui est malheureusement également incomplète (résidus 212 à 219 non visibles). En ce qui concerne FmhB, l'identification de condition de cristallogénèse de l'apoenzyme a permis en 2014 d'obtenir un cristal qui a diffracté à 2.63 Å. Malheureusement, toutes les tentatives de construction du modèle par remplacement moléculaire avec les transférases déjà décrites (FemX et FemA) ont échoué. Après de nombreux essais de phasage par le sélénium, c'est finalement l'obtention et le phasage de la structure d'un variant C⁷⁰S de FmhB en complexe avec du platine qui a permis de résoudre par remplacement moléculaire la structure de FmhB obtenue en 2014. En 2019, une autre équipe de recherche a obtenu la structure de FmhB (PDB : 6SNR) avec une meilleure résolution (1,62 Å) qui sera utilisée pour la comparaison de structures des transférases Fem. Cette structure n'a pas été analysée dans la littérature et n'apparaît que dans la PDB.

1. Prédiction de structure avec Alphafold2

Afin de réaliser une comparaison de structure des 3 transférases Fem de *S. aureus* sous leur forme d'apoenzyme, nous avons décidé d'utiliser Alphafold2 pour obtenir (i) une structure de FemA complète et (ii) un modèle de structure de FemB.

Alphafold2 est un nouveau logiciel d'intelligence artificiel, développé par DeepMind de Google, permettant la prédiction de structure tridimensionnelle de protéines. Alphafold2 utilise le « machine learning » et des alignements multiples de séquences pour prédire avec une efficacité jusque-là inégalée la structure tridimensionnelle des protéines seulement à partir de leurs séquences en acides aminés (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022). Même si le développement et la mise sur le marché de ce logiciel représente une avancée considérable pour le monde de la biologie, il présente encore quelques limitations. En effet, modéliser des complexes entre une protéine et un substrat reste encore impossible. Ainsi, des changements de conformation de protéines, liés à la fixation d'un ou plusieurs

ligands, ne sont pas encore modélisables. Alphafold2 est donc un outil supplémentaire et complémentaire des techniques de cristallographie aux rayons X et de cryo-microscopie électronique permettant la réalisation d'études structurales.

Lors de la modélisation le logiciel Alphafold2 calcule un score de confiance par résidu appelé « predicted local distance difference test » (pLDDT). Le score du test varie de 0 à 100. Les valeurs supérieures à 90 indiquent une confiance élevée, les valeurs entre 70 et 90 indiquent une bonne prédiction au niveau du squelette (backbone) de la protéine, tandis que les valeurs inférieures à 50 une confiance faible. Cette mesure estime si le résidu prédit possède des distances similaires aux atomes C α voisins (dans les 15 Å) en accord avec les distances dans les structures réelles. Ce score permet d'évaluer la pertinence et la qualité du modèle.

Un second paramètre appelé « predicted aligned error » (PAE) est calculé par Alphafold2 et permet d'évaluer l'erreur de distance pour chaque paire de résidus considérée. Il est souvent utilisé pour estimer la position de différents domaines au sein d'une même protéine. Le PAE donne l'estimation de l'erreur de position du résidu x quand la structure prédite et la structure dites « vraie » sont alignées sur le résidu y. Si la position relative de deux domaines est prédite avec confiance, les valeurs de PAE seront faibles (moins de 5 Å) pour les paires de résidus comprenant un résidu dans chaque domaine.

1.1. FemA de *S. aureus*

Bien que la structure de FemA soit disponible sur la PDB, elle n'est pas complète et certains domaines qui pourraient être importants pour la fixation des substrats sont manquants. Le modèle prédit par Alphafold nous permet donc (i) d'obtenir la structure complète et (ii) de valider la fiabilité des modèles calculés par Alphafold2 en regardant les paramètres pLDDT et PAE. Nous avons donc modélisé la structure de FemA afin de pouvoir comparer le meilleur modèle prédit (rank_1) avec la structure que nous avons obtenue en cristallographie aux rayons X.

Nous pouvons voir que les scores donnés par le test pLDDT sont tous au-dessus de 70 sauf pour les régions de la protéine comprenant les résidus absents de la structure PDB de FemA et de la structure de FemA que nous avons obtenue (**Figure 45A et 45B**). Ces résultats corrélaient avec les résultats du test PAE, où les plus grandes valeurs sont obtenues pour les mêmes résidus (en rouge sur la **Figure 45C**). Les valeurs PAE des autres résidus prédisent une position fiable des différents domaines de FemA (en bleu sur la **Figure 45C**). La structure de FemA obtenue en cristallographie et le meilleur modèle prédit par alphafold se superposent très bien avec une mesure RMSD de 0.571 Å pour une superposition de 377 atomes (**Figure 45B**). Tous ces résultats corrélaient vers le fait que le modèle prédit

par Alphafold2 est tout à fait pertinent pour l'analyse et la comparaison des structures des différentes Fem transférases de *S. aureus*.

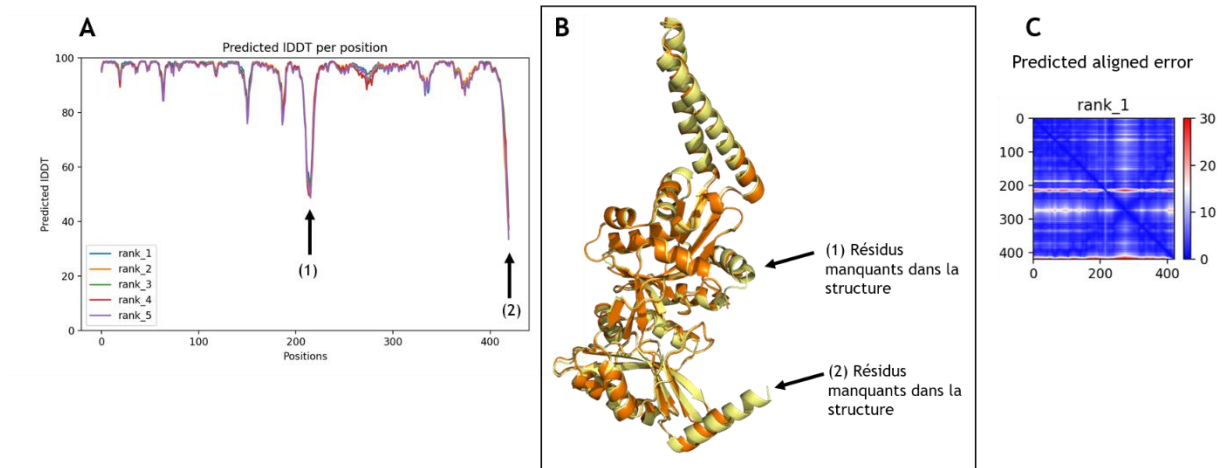


Figure 45 : Comparaison du modèle prédit par Alphafold2 et de la structure obtenue en cristallographie pour FemA.

(A) Profil pIDDT pour les différents modèles de FemA prédit par Alphafold2. Les flèches, également présentes dans le panel B, indiquent les régions absentes de la structure obtenues en cristallographie. (B) Alignement de la structure de FemA (en orange) avec le modèle rank_1 alphafold (en jaune). (C) Analyse PAE pour le modèle rank_1 de FemA prédit par Alphafold2.

1.2. FemB de *S. aureus*

Nous avons ensuite poursuivi avec la prédiction de structure de FemB pour laquelle aucune structure cristallographique n'est disponible. Le meilleur modèle prédit pour FemB est nommé rank_1 par Alphafold2. Nous pouvons observer des résultats similaires à ceux obtenus pour FemA que ce soit pour l'analyse pIDDT ou PAE. La majorité des résidus ont un score pIDDT supérieur à 80, et les régions prédites avec le moins de fiabilité se situent au niveau des mêmes résidus que pour FemA (**Figure 46A**). L'analyse PAE indique quant-à-elle un positionnement très fiable des différents domaines les uns par rapport aux autres (**Figure 46B**).

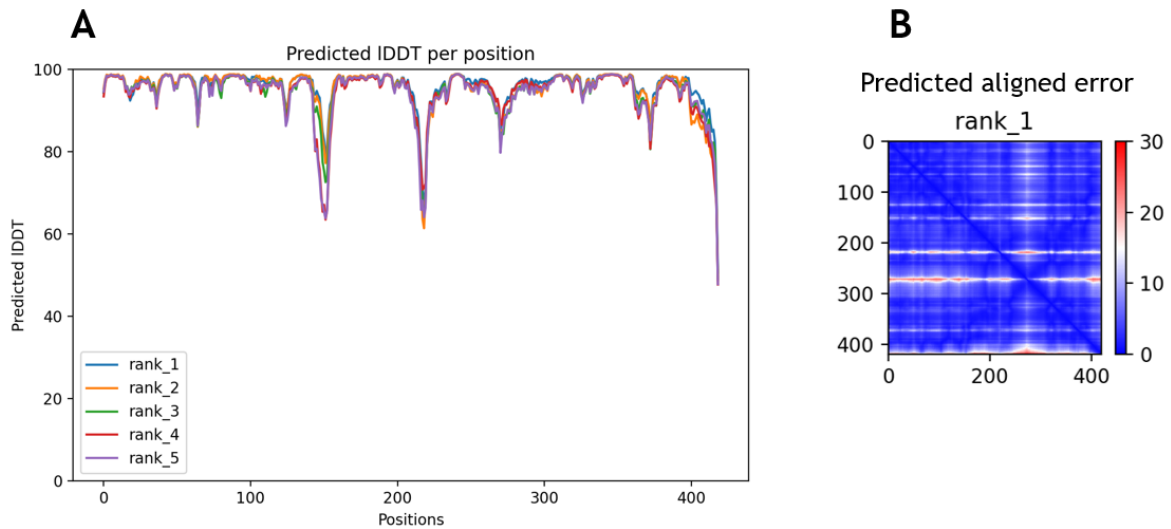


Figure 46 : Paramètres estimant la fiabilité des modèles prédits par AlphaFold2 pour FemB.
(A) Profil pIDDT pour les différents modèles de FemB prédit par AlphaFold2. **(B)** Analyse PAE pour le modèle rank_1 de FemB prédit par AlphaFold2.

2. Comparaison de structure des trois principales Fem transférases de *S. aureus*

2.1. Organisation structurale

Afin d'analyser et de comparer les structures des trois principales Fem transférases de *S. aureus*, un alignement de séquences a été réalisé et les différents motifs de structures secondaires identifiés ont été annotés et colorés (les feuillets β en rouge et les hélices α en bleu, **Figure 47**). Nous pouvons voir que les trois enzymes ont une structure générale très similaire. Elles sont composées d'un domaine globulaire composé d'hélices α et de feuillets β , qui est lui-même divisé en deux sous-domaines (1A et 1B) et possèdent toutes un domaine coiled-coil. Les domaines structuraux sont majoritairement conservés au sein de la structure des Fem. Le domaine coiled-coil est toujours formé par les hélices α_9 et α_{10} (encadré bleu **Figure 47A** et **Figure 47B**) quelque soit la Fem transférase étudiée.

Néanmoins des différences se situent au niveau des feuillets β (**Figure 47C**). FemA possèdent deux feuillets β de plus que FemB qui sont annotés β_6 et β_7 . Le feuillet β_6 est également présent dans la structure de FemB prédite par AlphaFold. En revanche la superposition des régions de FemB et FemA indiquent que l'organisation en feuillet β_7 présente chez FemA est absente de la structure prédite de FemB par AlphaFold, bien que les acides aminés soient présents (région non structurée). Le rôle de ces feuillets β surnuméraires chez FemA et FemB est encore inconnu.

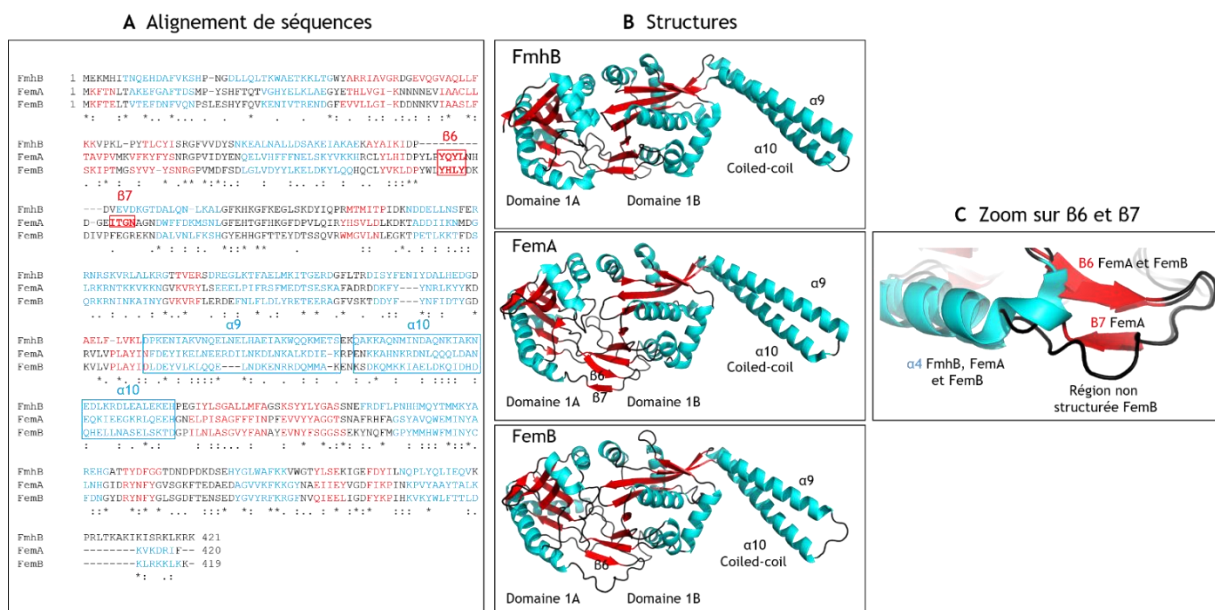


Figure 47 : Comparaison de structures de FmhB, FemA et FemB de *S. aureus*.

(A) Alignement de séquences des trois protéines et coloration des motifs structuraux à partir des structures. Les feuillettes β sont représentés en rouge, les hélices α en bleu et les régions non structurées en noir. (B) Structures de FmhB (PDB : 6SNR), de FemA (PDB : 1LRZ) et FemB (modèle AlphaFold2). (C) Zoom sur la région des feuillettes $\beta 6/\beta 7$.

2.2. Site catalytique

L'obtention des différentes structures de FemX_{Wv} et sa co-cristallisation avec un inhibiteur conjugué peptidyl-ARN ont permis de proposer un mécanisme catalytique de l'enzyme (décrit dans l'introduction paragraphe 3.2.5) et d'identifier les résidus participant à la catalyse. Il a été montré que la lysine catalytique 305 (K³⁰⁵) était à une distance compatible avec la formation de liaisons hydrogènes (environ 3 Å) avec la leucine 289 (L²⁸⁹) et la glycine 291 (G²⁹¹) et pouvait donc être stabilisée par ces deux résidus (Fonvielle et al., 2013a). Des travaux précédents réalisés dans mon équipe d'accueil ont également permis de mettre en évidence la conservation du motif FK comprenant la lysine catalytique chez les transférases Fem de *W. viridescens*, de *S. aureus*, de *B. burgdorferi* et de *S. coelicolor* (Biarrotte-Sorin et al., 2004). Afin de voir si les mécanismes catalytiques des Fem transférases de *S. aureus* et de la Fem modèle FemX de *W. viridescens* pouvaient être analogues nous avons analysé la correspondance des résidus entre les protéines et la géométrie de leurs sites catalytiques.

Les quatre enzymes étudiées sous leur forme d'apoenzymes partagent le même motif FK et la lysine est bien stabilisée par le « backbone » de deux résidus. La glycine identifiée chez FemX de *W. viridescens* est conservée chez les Fem de *S. aureus* et les distances entre la glycine et la lysine catalytique varient de 2.6 à 3.2 Å qui sont des distances compatibles avec la formation d'une liaison hydrogène. En revanche la nature du deuxième résidu varie en fonction de l'espèce étudiée, chez FemX_{Wv} il s'agit d'une leucine tandis que chez FmhB_{sa}, FemA_{sa} et FemB_{sa} il s'agit d'une phénylalanine. Les Fem de *S. aureus* partagent donc un motif FxG (où x est une glycine chez FmhB ou une tyrosine chez FemA et FemB) (**Figure 48**). La géométrie du site catalytique est donc conservée au sein des transférases Fem et laisse supposer un mécanisme enzymatique de transfert similaire de l'acide aminé de l'ARNt (Ala pour FemX et Gly pour les Fem_{sa}) sur la L-Lys³ du second substrat.

Néanmoins, FemA et FemB transférant chacune deux résidus glycyyl nous pouvons supposer une certaine flexibilité du site catalytique permettant son adaptation pour le transfert du second résidu glycyyl. Les résidus tyrosines du motif FYG de FemA et FemB, (Y³⁶⁴ de FemA et Y³⁶² de FemB) sont uniquement trouvés chez les transférases Fem catalysant deux réactions et pourraient possiblement jouer un rôle dans cette flexibilité du site catalytique, dans la catalyse et/ou dans la spécificité de substrats des Fem.

Résidus	FemX _{Wv}	FmhB _{Sa}	FemA _{Sa}	FemB _{Sa}
Motif FK	F304 K305	F373 K374	F382 K383	F380 K381
Résidus stabilisant K catalytique	L289 G291	F354 G356	F363 G365	F361 G363

```

FemXWv 289 LGGIESESTDDSD---LYVFKKHV 307
FmhBSa 354 FGGTDNDPKDSEHYGLWAFKKV 377
FemASa 363 FYG/SGKFTEAEDAGVVKFKKG 386
FemBSa 361 FYGLSGDFTENSEDYGVYRFKRG 384

```

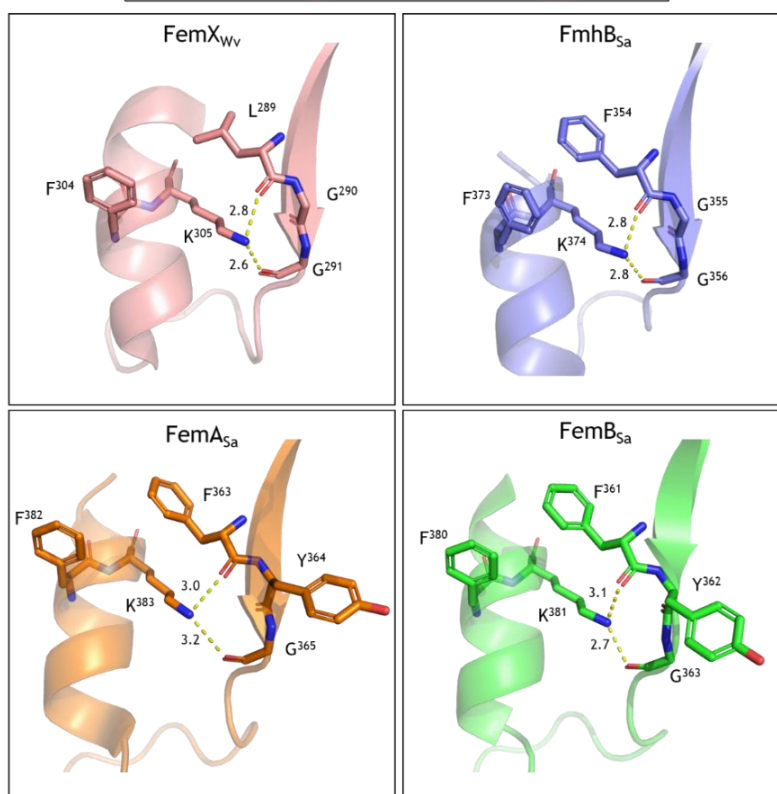


Figure 48 : Comparaison de la géométrie du site catalytique des transférases Fem.

FemX_{Wv} (PDB : 1NE9), FmhB_{Sa} (PDB : 6SNR), FemA_{Sa} (PDB : 1LRZ), et de FemB_{Sa} (modèle AlphaFold2). Les distances en Å sont indiquées par les lignes jaunes en pointillées.

Afin d'étudier l'interaction de FmhB avec ses substrats nous avons entrepris de co-cristalliser la protéine avec différentes molécules. Durant ma thèse, nous avons obtenu 3 nouvelles structures d'un variant (C⁷⁰S ou C⁷⁰S L²⁰⁶T) de FmhB en complexe avec un analogue de substrat lipide-II-C₁₀ ou une molécule bi-substrat qui seront décrites et analysées dans les parties ci-après. A notre connaissance, ce sont les premières structures de transférases Fem utilisant des lipides II comme substrats qui ont été obtenues et décrites.

3. Co-cristallisation de FmhB C⁷⁰S L²⁰⁶T avec un analogue de lipide II soluble

Après avoir identifié les conditions nous permettant d'obtenir la structure du variant C⁷⁰S de FmhB en complexe avec du platine, nous avons décidé de faire des essais de co-cristallisation de la protéine avec un analogue de lipide II soluble portant un groupement diprényl. Lors de l'étape de formation et de dépôt des gouttes par le robot Mosquito (TPP Labtech) l'enzyme et le ligand ont été mélangés à un ratio 1/10. Nous avons obtenu un cristal qui a diffracté à une résolution de 2,98 Å. L'analyse et l'interprétation de la carte de densité électronique ne nous a permis de placer que partiellement l'analogue de lipide II dans la structure, le GlcNAc, la L-Ala¹ et la partie diprényl étant impossible à positionner.

Afin d'obtenir une structure avec une meilleure résolution nous avons essayé d'améliorer l'affinité de la protéine pour le ligand. Chez FemX_{wv}, il a été montré que la thréonine 209 (T²⁰⁹) pouvait jouer un effet stabilisateur de l'UM5K dans la poche catalytique via une possible liaison hydrogène avec l'acide carboxylique du D-iGlu² (Fonvielle et al., 2013a). Or chez FmhB, l'équivalent de cette thréonine est une leucine 206 (L²⁰⁶). Nous avons donc décidé de construire, produire et purifier un nouveau variant de FmhB C⁷⁰S possédant une T²⁰⁶ à la place de la leucine (FmhB C⁷⁰S L²⁰⁶T) puis de co-cristalliser la protéine avec le ligand dans les mêmes conditions que précédemment. Ainsi, nous avons obtenu une nouvelle structure à une résolution de 1,74 Å nous permettant de positionner la totalité du ligand dans la carte de densité électronique (**Figure 49A**) et d'étudier son positionnement au sein de la protéine. Nous avons ainsi mis en évidence que le ligand se place dans une cavité située à l'interface des deux sous domaines 1A et 1B du domaine globulaire de la protéine, qui est directement en contact avec le solvant (**Figure 49B**). L'activité de la protéine FmhB C⁷⁰S L²⁰⁶T a été testée et aucune différence significative mesurable n'a été observée comparée à l'activité de la protéine native.

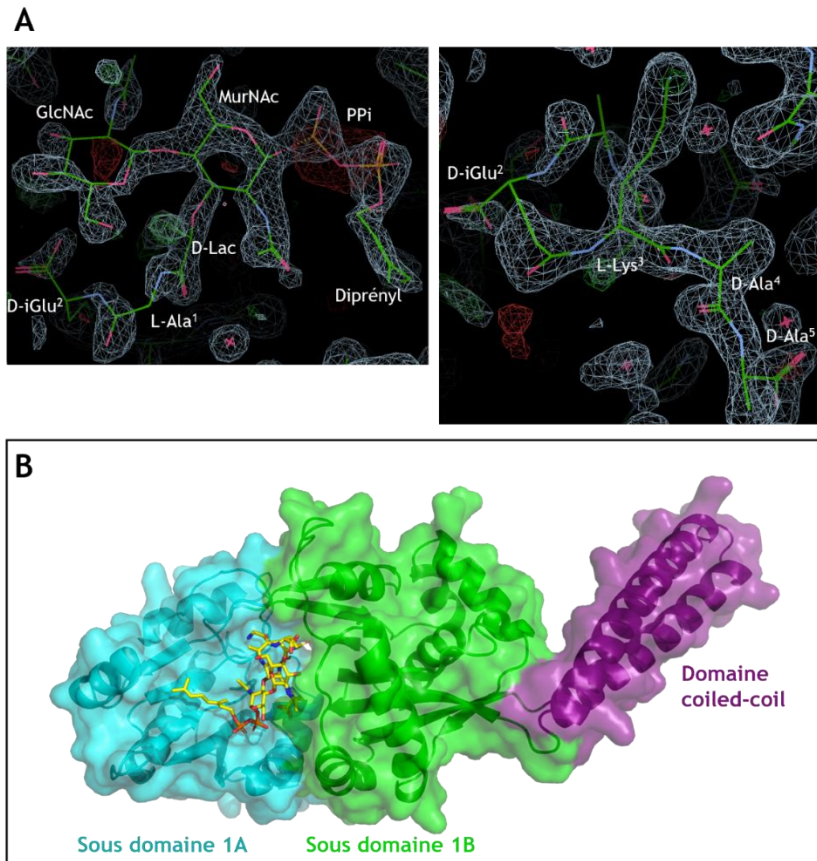


Figure 49 : Structure de FmhB C⁷⁰S L²⁰⁶T en complexe avec un analogue de lipide II soluble.

(A) Placement du ligand dans la carte de densité électronique. Carte de densité électronique coupée à 1 sigma. (B) Positionnement du ligand (en jaune) au sein de la protéine. Les sous domaine 1A et 1B et le coiled-coil sont respectivement colorés en cyan, vert et violet.

La comparaison des structures de FmhB sous forme d'apoenzyme et en complexe avec l'analogue de lipide soluble n'a pas indiqué de différences structurales majeures (RMSD de 0,376 Å pour la superposition de 297 atomes).

Interaction de la protéine avec son ligand

A partir de la structure obtenue, une carte indiquant les distances pouvant être compatibles avec la formation de liaisons hydrogènes entre les résidus de la protéine et les différents groupements chimiques du ligand a été construite (**Figure 50**). Toutes ces probables interactions doivent rentrer en jeu dans la conformation adoptée par le substrat dans la poche catalytique de l'enzyme.

Pour simplifier l'interprétation, j'analyserai cette carte par étapes dans les différentes sous parties qui suivent ci-dessous.

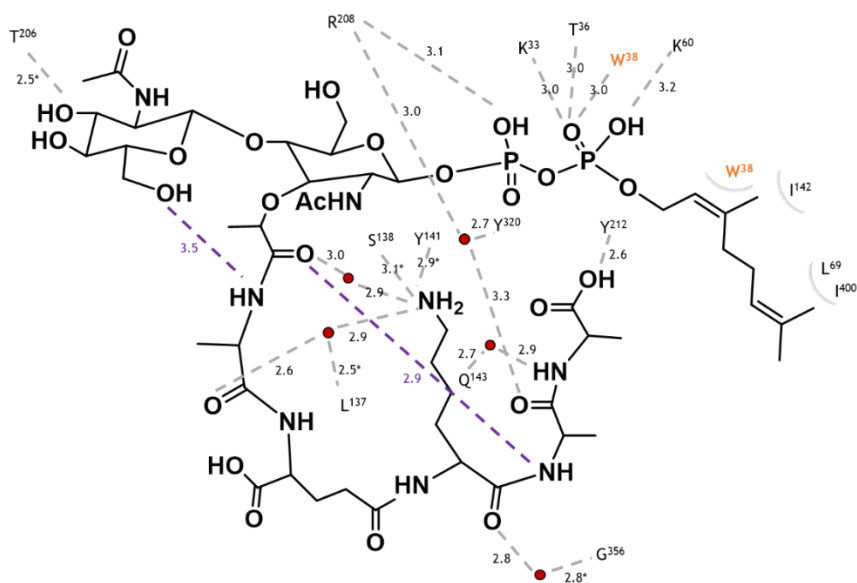


Figure 50 : Carte des interactions possibles entre la protéine et le ligand (analogue de lipide).

Les distances en Å sont indiquées à côté des lignes en pointillées, celles possédant un astérisque indiquent une interaction avec le « backbone » du résidu concerné. Les distances intramoléculaires au sein de lipide II soluble sont indiquées en violet, celles avec les résidus de la protéine sont en gris. Les molécules d'eau sont représentées par les cercles rouges. Les résidus W³⁸ est coloré en orange et est présent deux fois sur le schéma pour simplifier la représentation. Les cils indiquent une interaction hydrophobe. (Les groupements phosphates et acides carboxyliques sont arbitrairement représentés sous leur forme protonée).

3.1. Environnement des sucres, du PPI et du motif diprényle

Les deux sucres se logent dans une cavité située à la surface de la protéine qui est directement en contact avec le solvant. Le GlcNAc semble être stabilisé par le « backbone » de la T²⁰⁶ qui pourrait interagir avec son groupement carbonyle (distance de 2.5 Å). La T²⁰⁶ semble donc impliquée dans la stabilisation du 2nd sucre chez FmhB alors que chez FemX_{Wv} elle interagit le D-iGlu². Le MurNAc ne semble pas former de liaison avec les résidus de la protéine dans cette conformation.

Les différents atomes du pyrophosphate (PPI) sont situés à des distances compatibles avec la formation de liaisons hydrogènes avec les chaînes latérales de cinq résidus de la protéine : R²⁰⁸, la lysine 33 (K³³), la lysine 60 (K⁶⁰), le tryptophane 38 (W³⁸) et enfin la thréonine 36 (T³⁶) (**Figure 51A**).

L'analyse de la structure nous a également permis d'observer que le motif diprényle se loge dans un sillon constitué par des résidus hydrophobes (colorés en violet sur la **Figure 51B**) à la surface de FmhB. Ainsi, le W³⁸, la leucine 69 (L⁶⁹), l'isoleucine 142 (I¹⁴²) et l'isoleucine 400 (I⁴⁰⁰) pourraient être impliqués dans des interactions hydrophobes avec la chaîne carbonée du motif. Le sillon hydrophobe se poursuit, suggérant qu'une partie du motif undecaprényle du substrat naturel de FmhB pourrait s'y

positionner et être stabilisée par des interactions hydrophobes de part et d'autre de ces carbones (**Figure 51B**), tandis que le reste du motif serait enchâssé dans la membrane plasmique. Afin d'étudier cette hypothèse il serait intéressant de synthétiser un analogue de lipide portant un motif lipidique plus long et co-cristalliser cette nouvelle molécule avec l'enzyme et étudier son positionnement dans le site catalytique.

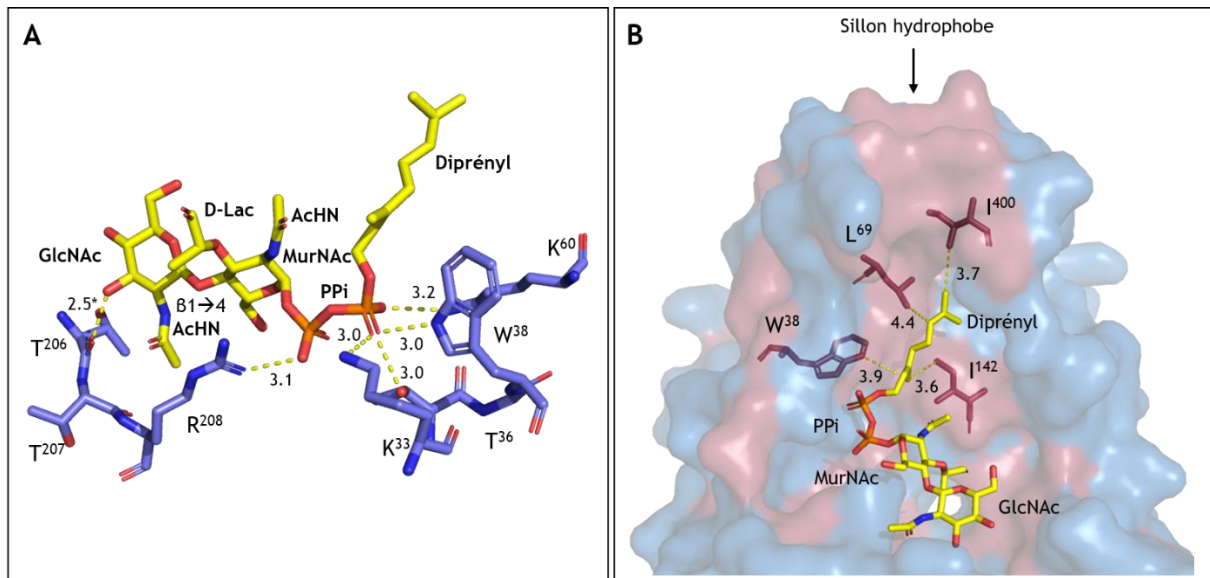


Figure 51 : Positionnement des sucres, du PPI et du diprényl.

(A) Les distances en Å entre les sucres et le PPI du lipide II à diprényl avec les résidus de la protéine sont indiquées par les lignes en pointillés jaunes. La valeur avec un astérisque indique une interaction avec le « backbone » du résidu. **(B)** Positionnement possible du motif diprényl au niveau d'un sillon hydrophobe de la protéine.

3.2. Environnement de la L-Ala¹ du D-iGlu²

L'alanine du substrat en position 1 pourrait interagir avec le groupement hydroxyle du GlcNAc, ce qui contribuerait à maintenir le sucre dans la bonne conformation. La L-Ala¹ pourrait également être stabilisée par le « backbone » de la leucine 137 (L¹³⁷) via l'intermédiaire d'une molécule d'eau (E2). Les interactions décrites ci-dessus sont présentées sur la **Figure 53**.

L'environnement du D-iGlu² a été exploré et seuls l'acide glutamique 366 (E³⁶⁶) et l'histidine 367 (H³⁶⁷) ont été localisés à des distances respectives de 4,4 et 3,7 Å de son groupement acide carboxylique. Ces résidus pourraient être impliqués dans la spécificité de substrat de FmhB pour le lipide-II-C₁₀ non amidé. Chez toutes les transférases Fem de *S. aureus*, le résidu acide glutamique est conservé. En revanche l'histidine (chargé positivement à pH physiologique) est remplacée par un acide

aspartique chez FemA et FemB (chargé négativement à pH physiologique). Ce changement de résidu et de charge pourrait expliquer la différence de spécificité des enzymes.

3.3. D-Ala⁴ et la D-Ala⁵ terminale

L'analyse de la structure a finalement conduit à l'identification des résidus pouvant être impliqués dans des interactions avec la D-Ala⁴ et la D-Ala⁵ terminale du ligand.

La tyrosine 320 (Y³²⁰) et R²⁰⁸ pourraient contribuer à stabiliser la D-Ala⁴ par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (E4) qui est située à 3.3 Å de son groupement carbonyle. La glutamine 143 (Q¹⁴³) est située à une distance de 2.7 Å de la molécule d'eau E3, interagissant elle-même avec le groupement NH de la D-Ala⁵ engagé dans la liaison peptidique avec la D-Ala⁴. Le groupement hydroxyle de la tyrosine 212 (Y²¹²) pourrait être engagé dans une liaison hydrogène avec le groupement acide carboxylique de la D-Ala⁵ (distants de 2.6 Å) (**Figure 52**). Le groupe NH de la D-Ala⁴ pourrait également être engagé dans une liaison hydrogène avec le groupement carbonyle du D-Lac, et permettre ainsi la formation d'une liaison intramoléculaire au substrat (sur la carte présentée **Figure 50**, distance violette de 2.9 Å).

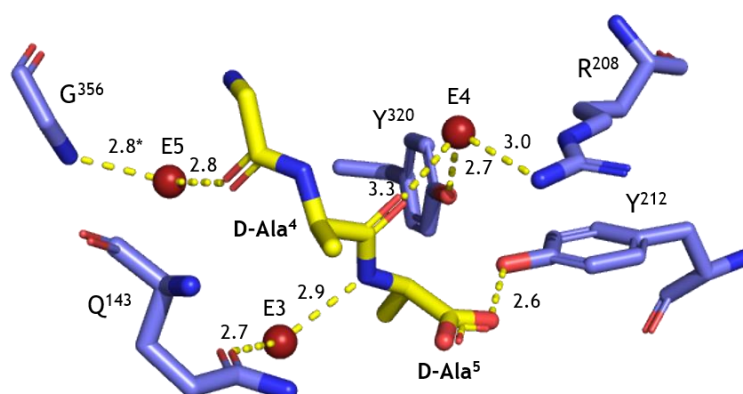


Figure 52 : Réseau possible d'interactions entre D-Ala⁴ - D-Ala⁵ du substrat et la protéine. Les distances sont indiquées par les lignes pointillées en jaune et les valeurs sont en Å. La valeur avec un astérisque indique une interaction avec le « backbone » du résidu.

3.4. Environnement de la L-Lys³

Il est particulièrement intéressant d'étudier le placement de la L-Lys³ du substrat dans le site catalytique de l'enzyme, car elle doit se positionner de manière à permettre le transfert de la glycine du Gly-ARNt^{Gly} vers le lipide II. Cette L-lysine semble stabilisée par un réseau de liaisons hydrogènes impliquant des résidus de la protéine et des résidus du lipide II via l'intermédiaire de deux molécules d'eau. Les deux molécules d'eau E1 et E2 sont positionnées de façon à servir d'intermédiaire respectifs

entre le groupement carbonyle du D-Lac et le groupement carbonyle de la L-Ala¹ et le groupement NH₂ de la L-Lys³. La molécule d'eau E2 est également localisée à 2.5 Å du groupement carbonyle de la L¹³⁷. La L-Lys³ est aussi stabilisée de manière directe par des résidus de la protéine via les groupements carbonyles des résidus S¹³⁸ et Y¹⁴¹ (**Figure 53**).

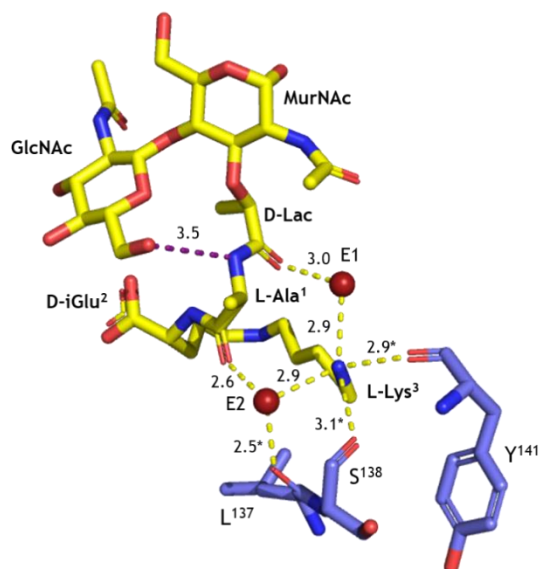


Figure 53 : Réseau possible d'interactions entre la L-Ala¹, le D-iGlu² et la L-Lys³ du substrat avec la protéine.

Les distances sont indiquées par les lignes pointillées en jaune et les valeurs sont en Å. Les valeurs possédant un astérisque indiquent une interaction avec le carbonyle du résidu.

Nous avons ensuite étudié le positionnement de la lysine 374 de la protéine. Cette lysine, identifiée par alignement de séquences des différentes transférases Fem, est conservée chez l'ensemble de ces enzymes et serait le résidu permettant de stabiliser l'intermédiaire oxyanion qui apparaîtrait lors de la réaction de transfert de l'acide aminé de l'ARNt aminoacylé vers le lipide II. Ce mécanisme enzymatique a été proposé pour FemX et pourrait être étendu à FmhB (**Figure 54**).

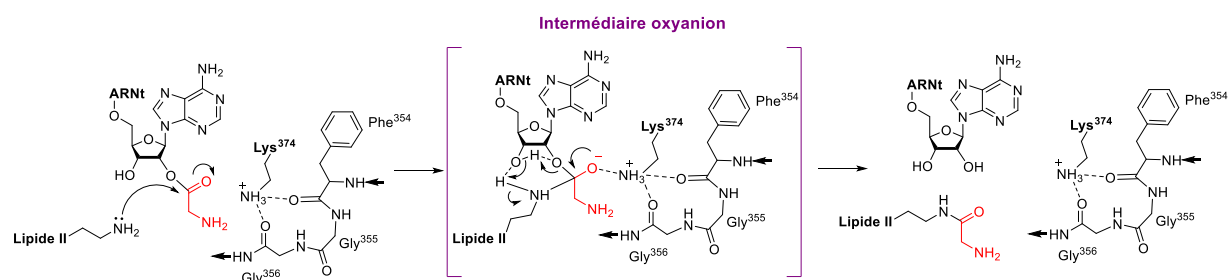


Figure 54 : Mécanisme enzymatique proposée pour FmhB.

L'analyse de la structure du complexe entre FmhB et le lipide II nous a permis de mettre en évidence que la chaîne latérale la L-Lys³ du lipide est positionnée à l'opposé de la lysine catalytique (**Figure 55A**). Un tel positionnement ne peut pas permettre à ce résidu de participer à la réaction catalytique. Un positionnement similaire de la lysine de l'UM5K avait été observé dans le site catalytique de FemX_{wv} (**Figure 55B**). Dans une étude suivante, il avait également été montré que la fixation d'un inhibiteur bi-substrat, comportant une partie ARN mimant le bras accepteur de l'ARNt avait pour conséquence un changement de conformation de l'enzyme et un placement différent du résidu en position 3 (L-Cys³) de la partie peptidique de la molécule bi-substrat (**Figure 55C**) (Fonvielle et al., 2013a).

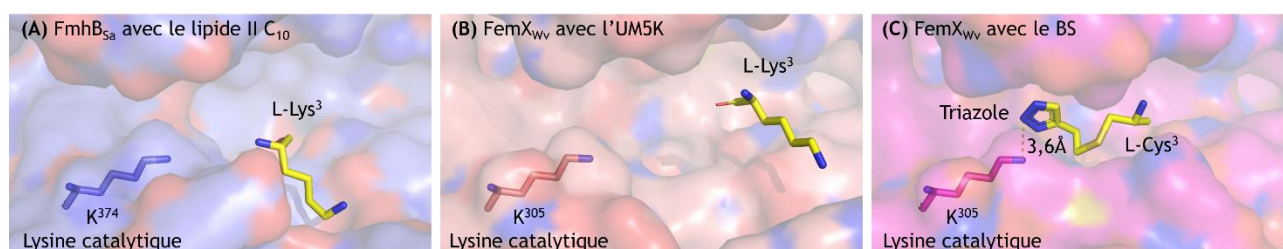


Figure 55 : Orientation de la chaîne latérale du résidu 3 du pentapeptide du ligand.

(A) Positionnement de la chaîne latérale de la L-Lys³ du lipide et de la lysine catalytique de FmhB de *S. aureus*. (B) Positionnement de la chaîne latérale de la L-Lys³ de l'UM5K et de la lysine catalytique de FemX de *W. viridescens* (PDB : 1P4N). (C) Positionnement de la L-Cys³ et du triazole du bi-substrat et de la lysine catalytique de FemX de *W. viridescens* (PDB : 4I19).

De façon à étudier la conséquence de la fixation du substrat ARN sur d'éventuels changement conformationnel de la protéine et du lipide II nous avons synthétisé et co-cristallisé avec FmhB des inhibiteurs de type bi-substrats réunissant en une seule molécule un analogue de lipide II soluble et un analogue d'ARNt mimant le bras accepteur de ce dernier.

4. Co-cristallisation avec des bi-substrats

La co-cristallisation d'acides nucléiques, de peptides possédant un groupement lipidique et de protéines, reste aujourd'hui un défi en raison de leurs propriétés physico-chimiques très différentes. Une stratégie pour contourner cette problématique repose sur l'hémi-synthèse de molécules bi-substrats (BS). En effet, l'étude enzymologique et cristallographique menée sur FemX de *W. viridescens* a permis de montrer qu'un BS avec une partie ARN minimale (2 appariements liés par un polyéthylène

glycol) possède des capacités d'inhibition de l'enzyme et permet d'obtenir un complexe avec la protéine diffractant à haute résolution (1,66 Å) (Fonvielle et al., 2013a).

4.1. Synthèse des inhibiteurs bi-substrats

Les BS sont des molécules réunissant une partie des deux substrats des Fem : une partie ARN lié un analogue de lipide II portant un motif diprényl.

Trois ARN de taille différente (8, 12 et 18 bases) ont été synthétisés par synthèse sur support solide (SPS) par l'équipe de collaborateurs du Pr. Tom Brown (Université d'Oxford). Les sucres de l'adénosine terminale de ces ARN portent un groupement azido (N_3) en position 2'. Le précurseur DMT-adenosine-2'azido-phosphoramidite, permettant l'insertion de cette modification a été synthétisé par l'équipe du Pr. Mélanie Ethève-Quellejeu. Les séquences des ARN ont été choisies pour être identiques à celle du bras accepteur de tous les ARNt non protéogéniques.

La partie lipidique des BS a été obtenue par héli-synthèse. L'UDP-MurNAC à mesocystine a été synthétisé par une série de réactions enzymatiques catalysées par les Mur ligases (MurC ,D , E et F) en collaboration avec l'équipe de Thierry Touzé (I2BC, Paris-Saclay). Puis des étapes de chimie organiques nous ont permis d'obtenir le précurseur UDP-MurNAC-pentapeptide à thioalcyne, comportant un résidu alcyne à la place de l'amine de la chaîne latérale de la L-Lys³ du substrat naturel. Enfin, l'action concertée de MurG et MraY nous a permis d'obtenir l'intermédiaire lipidique II à C₁₀ (Fonvielle et al., 2018).

Les trois BS ont ensuite été obtenus par une réaction catalysée par le cuivre (I), dite de « chimie click », entre le groupement alcyne du précurseur lipidique et le groupement azido de l'ARN choisi (**Figure 56**).

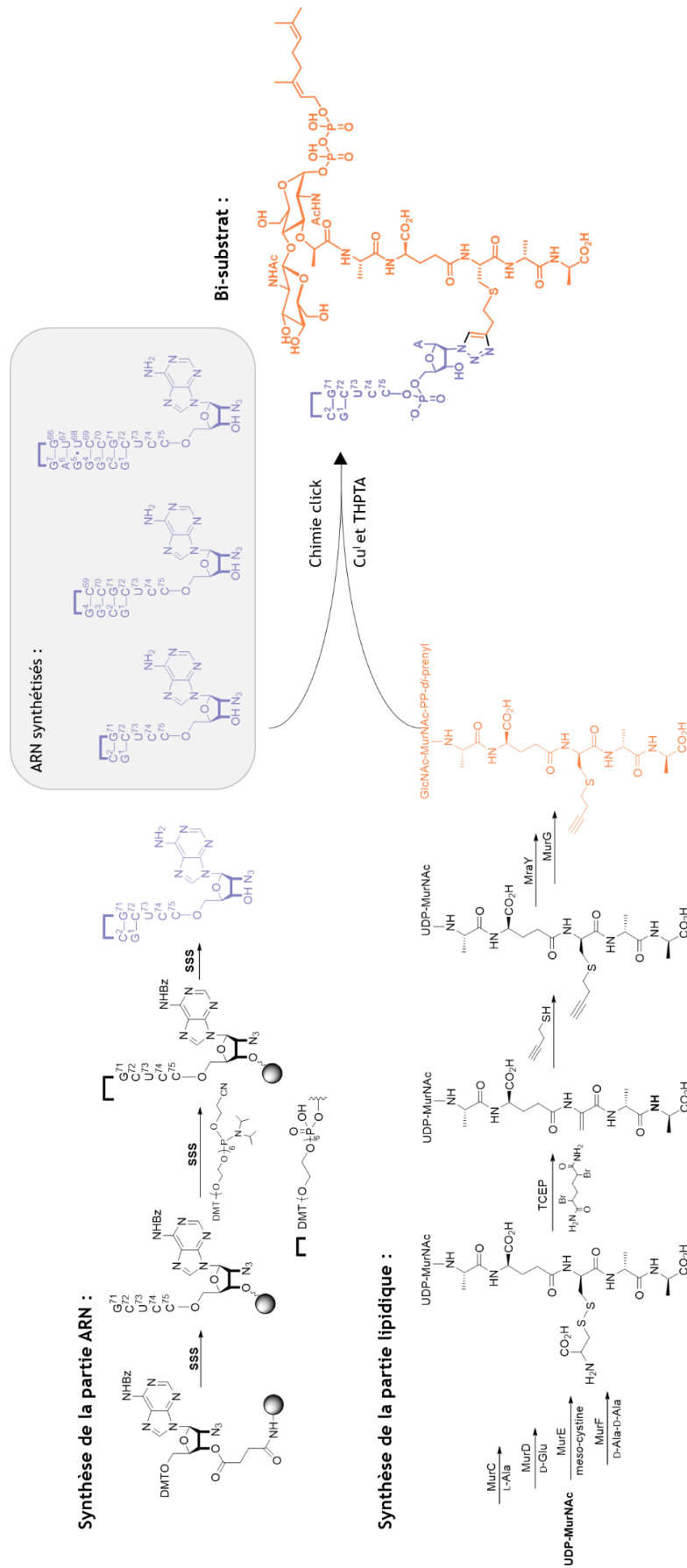


Figure 56 : Synthèse des bi-substrats.

4.2. Affinité de FmhB pour les bi-substrats

Afin d'évaluer l'affinité de FmhB pour les trois molécules BS synthétisées nous les avons testés comme inhibiteur de l'enzyme (test d'inhibition présenté sur la **Figure 57**).

Le BS 1, qui possède un ARN de 8 nucléotides dont deux appariements, possède un K_i de 4,1 μM . Le BS 2, composé d'un ARN de 12 nucléotides avec 4 appariements, a quant-à-lui un K_i de 2,1 μM . Et enfin, le BS 3, avec un ARN de 18 nucléotides dont 6 appariements et un mésappariement possède un K_i de 7,5 nM (**Figure 57**). Les valeurs de K_i obtenues sont proportionnelles à la taille de l'ARN des molécules et le K_i le plus faible, traduisant une plus grande affinité de l'enzyme, a donc été obtenu pour le BS qui possède la partie ARN la plus longue. Cette corrélation entre taille de l'ARN des BS et affinité de l'enzyme avait déjà été observée lors d'une étude précédente réalisée sur FemX de *W. viridescens* (Fonvielle et al., 2013a). Les sucres, les phosphates et les bases du bras accepteur de l'ARN semblent donc jouer un rôle dans la fixation et dans l'affinité de la protéine pour les ARN, bien que cette région ne permette pas aux Fem transférase de discriminer les différents isoaccepteurs de Gly-ARNt^{Gly} (Rietmeyer et al., 2021).

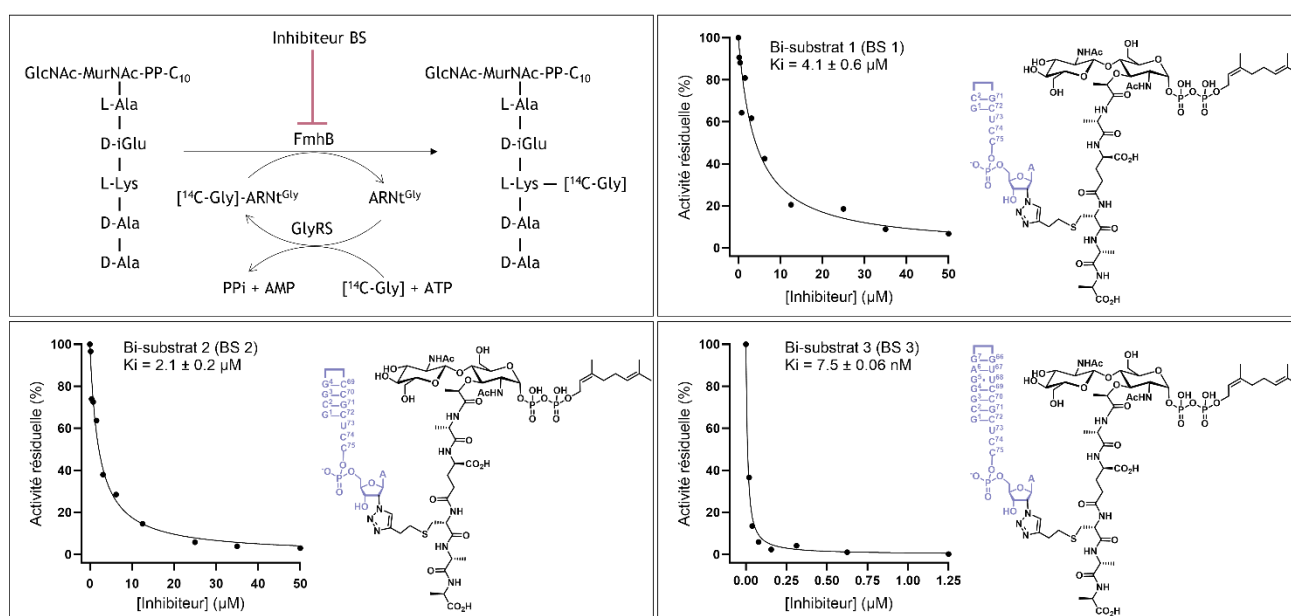


Figure 57 : Test d'inhibition de FmhB par les bi-substrats.

4.3. Co-cristallisation de FmhB C⁷⁰S L²⁰⁶T avec une molécule bi-substrat

De façon à étudier l'impact de la fixation des deux substrats sur d'éventuels changements conformationnels de la protéine nous avons entrepris de co-cristalliser avec FmhB C⁷⁰S L²⁰⁶T avec les bi-substrats.

La quantité d'ARN fonctionnalisé disponible (quelques dizaines de nmoles) ainsi que la complexité et le rendement de synthèse des molécules bi-substrats se sont révélés très rapidement être des paramètres limitants pour cette étude. Nous avons donc fait le choix de co-cristalliser la protéine uniquement avec les BS 1 et BS 2 que nous avons obtenu en quantité plus importante. Les conditions de cristallographie initiales choisies ont été celles ayant permis l'obtention de la structure de l'enzyme avec le lipide-II-C₁₀. Nous avons été contraints de diminuer le ratio enzyme/ligand à 1 pour 5 du fait des quantités limitées de BS disponibles. Après de multiples essais de cristallisation et un screening où nous avons fait varier la concentration de précipitants (PEG), nous avons réussi à obtenir des cristaux du complexe FmhB C⁷⁰S L²⁰⁶T avec le BS 1. Ces cristaux ont diffracté à une résolution moyenne de 3,96 Å. Les essais de co-cristallisation de la protéine avec le BS 2 sont restés sans succès. La taille de l'ARN semblant avoir un effet négatif sur la cristallogenèse du complexe, nous n'avons pas essayé de co-cristalliser FmhB C⁷⁰S L²⁰⁶T en présence de BS 3.

La structure obtenue nous a permis de placer de manière partielle le BS dans la cavité catalytique de la protéine. Toute la partie peptidique ainsi que le MurNAc et le PPI ont pu être placés dans la carte de densité électronique. En revanche, le GlcNAc, le motif diprényl complet et la partie ARN n'ont pas pu être positionnés de part une absence de densité détectable (**Figure 58A**). La partie lipidique du BS 1 est toujours située à l'interface des deux sous-domaines 1A et 1B (**Figure 58B**) néanmoins des modifications conformationnelles notables de la protéine en présence de ce BS ont été observées.

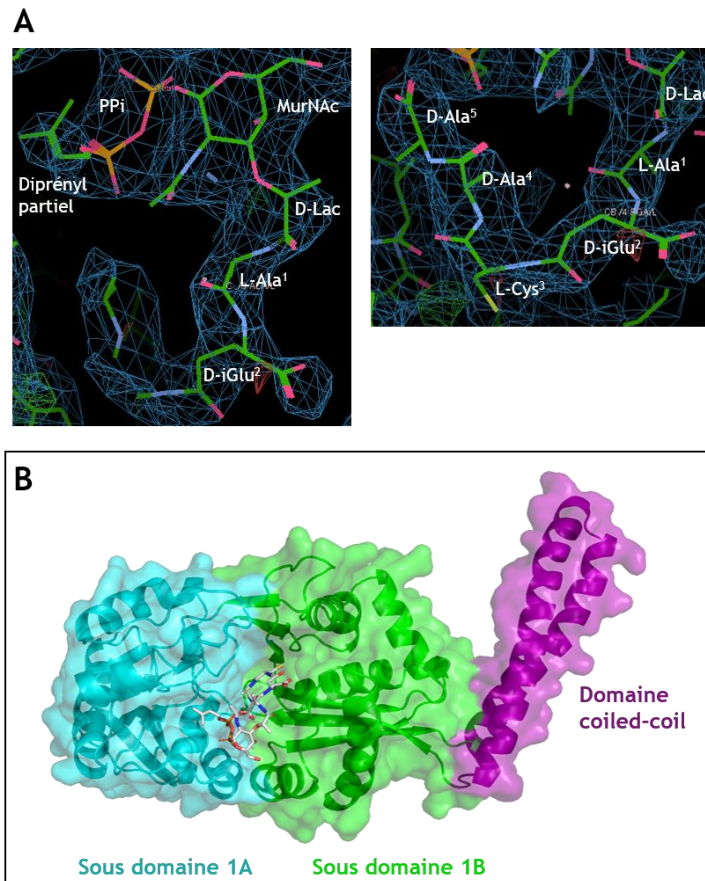


Figure 58 : Structure de FmhB C^{70S} L^{206T} en complexe avec le BS 1.

(A) Placement du ligand dans la carte de densité électronique. Carte de densité électronique coupée à 1 sigma. (B) Positionnement du ligand (en blanc) au sein de la protéine. Les sous domaine 1A et 1B et le coiled-coil sont respectivement colorés en cyan, vert et violet.

L'alignement de la protéine en complexe avec l'analogue de lipide ou avec le BS 1 indique un changement de la conformation de la protéine (RMSD de 0,764 Å pour la superposition de 311 atomes). La différence la plus significative se situe au niveau de l'orientation du domaine coiled-coil qui a pivoté de 35° en présence du BS1 (Figure 59A). Des modifications structurales sont également observées au niveau du sillon catalytique de la protéine lorsque l'on compare les complexes FmhB:lipide-II-C10 et FmhB:BS 1 (Figure 59B et 59C, flèches noires). Nous pensons que l'ensemble de ces changements conformationnels sont dû à la présence de la partie ARN du BS 1 bien qu'elle ne soit pas positionnable dans la structure.

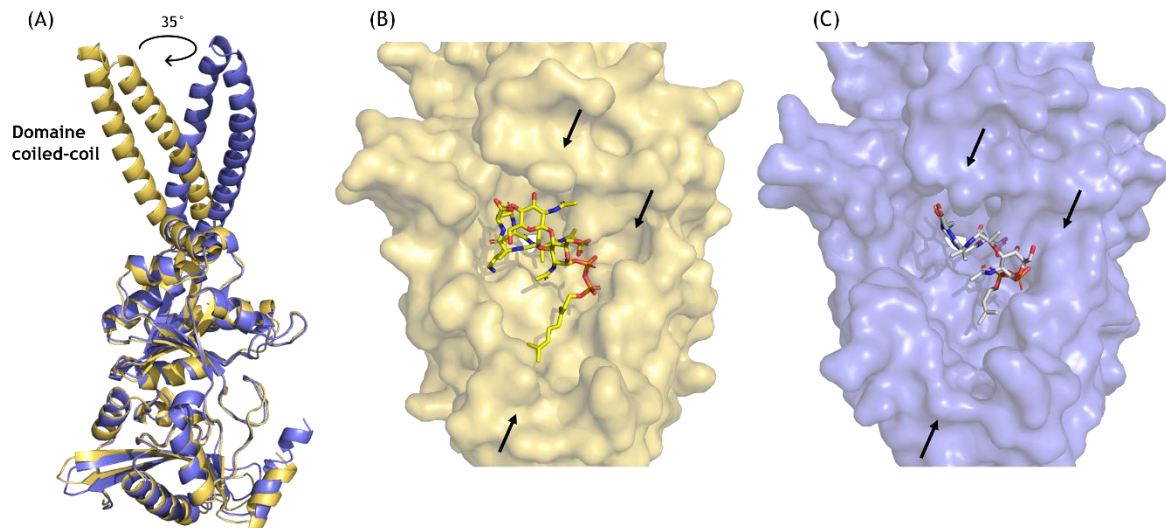


Figure 59 : Comparaison des structures de FmhB C⁷⁰S L²⁰⁶T obtenues en complexe avec un lipide. (A) Rotation du domaine coiled-coil en présence du BS 1. La protéine en complexe avec le BS 1 est représenté en bleu et celle en complexe avec le lipide en jaune. (B) Positionnement du lipide-II-C₁₀ dans le sillon catalytique de FmhB. (C) Positionnement de la partie lipide II du BS1 dans le sillon catalytique de FmhB. Les flèches noires indiquent les changements majeurs de conformation de la protéine lors de la complexation avec un BS à la place d'un analogue de lipide II.

Interaction de la protéine avec le BS 1

A partir de la structure, et comme pour le substrat lipidique, nous avons construit une carte indiquant les distances compatibles avec la formation de liaisons hydrogènes (**Figure 60**). Cette carte sera analysée dans différentes sous parties et la structure sera comparée avec celle obtenue avec l'analogue de lipide soluble.

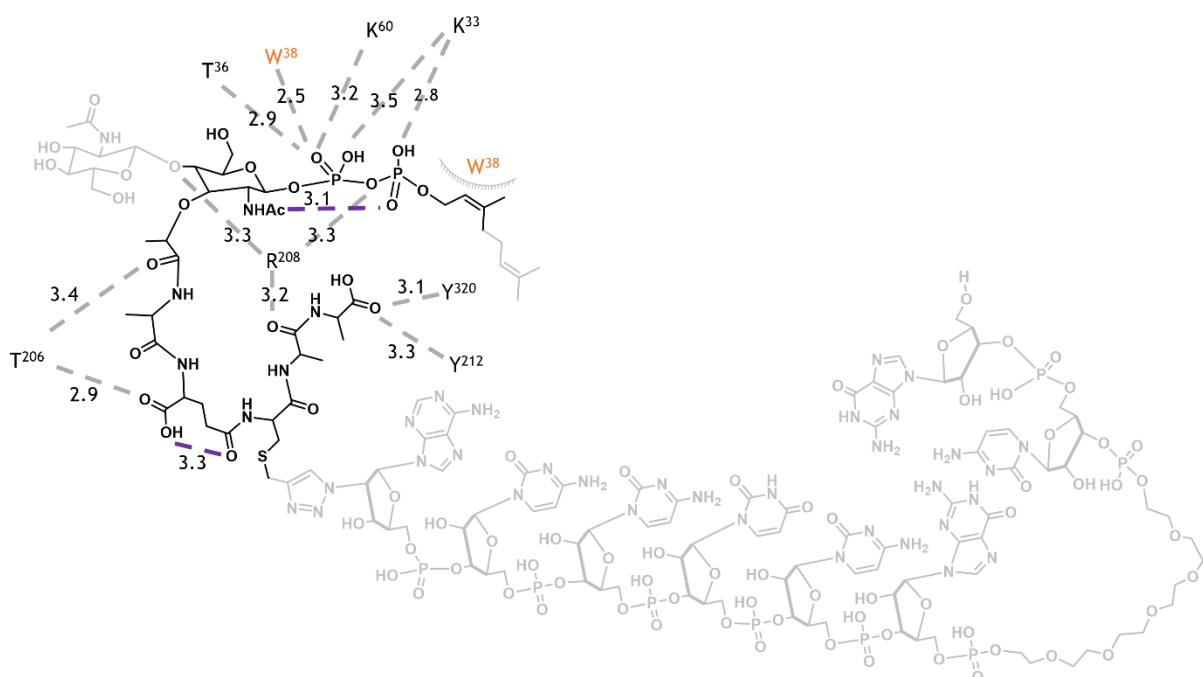


Figure 60 : Carte des interactions possibles entre FmHB C⁷⁰S L²⁰⁶T et le BS 1.

Les distances sont indiquées en Å par les lignes pointillées. Les distances intramoléculaires au BS 1 sont colorées en violet. Les parties grisées du BS 1 ne sont pas visibles dans la structure. (Les groupements phosphates et acides carboxyliques sont arbitrairement représentés sous leur forme protonée).

4.3.1. Environnement du MurNAc et du PPI

Les mêmes résidus que décrits précédemment avec l'analogue de lipide soluble sont retrouvés à proximité du sucre et du PPI. Ainsi K⁶⁰, W³⁸, T³⁶, K³³ et R²⁰⁸ semblent toujours interagir et stabiliser le PPI. En absence du GlcNAc, R²⁰⁸ pourrait interagir avec l'oxygène normalement engagé dans la liaison $\beta 1 \rightarrow 4$ reliant les deux sucres. Dans cette conformation la T²⁰⁶ qui stabilisait précédemment le GlcNAc pourrait se trouver engagée dans une liaison hydrogène avec le groupement D-Lac du MurNAc (**Figure 61**).

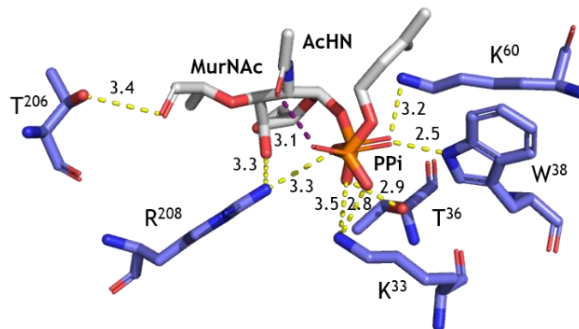


Figure 61 : Interaction du MurNAc et du PPI du BS 1 avec les résidus de la protéine.

Les distances sont indiquées en Å par les lignes pointillées jaune. La distance en violet représente une liaison intramoléculaire au sein du BS 1.

En effet, le MurNAc n'est pas positionné de la même manière que dans la structure obtenue en complexe avec le lipide-II-C₁₀ (**Figure 62**). Ce changement doit donc entraîner un positionnement différent pour le second sucre, le GlcNAc qui n'est pas visible dans la structure, et qui devrait être théoriquement situé au niveau de l'extrémité de la flèche noire sur la **figure 62**. La région non structurée située entre les hélices $\alpha 7$ et $\alpha 8$, comportant notre substitution L²⁰⁶T, semble importante pour le positionnement des sucres. Nous pensons que la présence de la partie ARN du BS pourrait mener au changement de conformation de la protéine et au rapprochement de cette région. La leucine 206 pourrait alors entraîner un encombrement stérique conduisant au déplacement des sucres et à leur repositionnement.

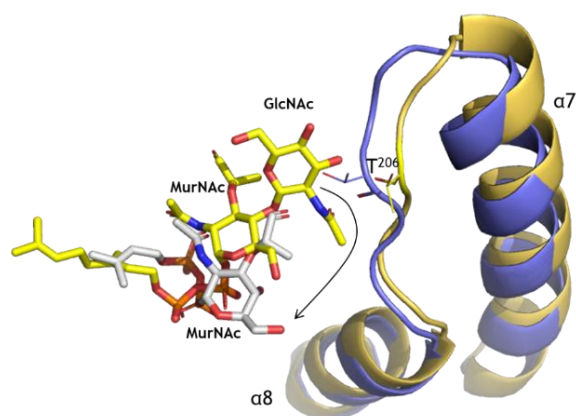


Figure 62 : Changement de positionnement du MurNAc.

L'enzyme en bleu est complexée avec le BS 1 en blanc, tandis que l'enzyme en jaune est complexée avec le lipide-II-C₁₀ qui est également coloré en jaune (sous forme de sticks).

Ce changement conformationnel de la protéine et des sucres du lipide II induit par le BS 1, qui mime la présence de l'ARNt aminoacylé et du lipide II dans le site actif de l'enzyme, pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas identifié de résidus de la protéine en interaction avec le motif GlcNAc du lipide II dans le complexe FmhB:lipide II. Cette observation est particulièrement intéressante étant donné que FmhB ne peut pas catalyser sa réaction en utilisant le lipide I (dépourvu du motif GlcNAc) comme substrat. Le motif GlcNAc pourrait être impliqué dans le changement de conformation de FmhB lorsque l'ARNt aminoacylé se positionne dans son site catalytique. En absence de ce changement conformationnel, les deux substrats ne seraient pas correctement positionnés pour permettre la catalyse. A cela, pourrait s'ajouter une plus faible affinité de l'enzyme pour le lipide I que pour le lipide II. Ces deux phénomènes pourraient être impliqués dans la spécificité étroite de substrat de FmhB.

Affinité de FmhB pour le lipide I

Afin d'évaluer l'impact de l'absence du GlcNAc sur l'affinité de FmhB pour le lipide, nous avons synthétisé et testé un inhibiteur possédant un motif terminal glycol sous sa forme de lipide I (lipide-I-C₁₀-glycol).

Nous avons observé que cette molécule n'a aucune capacité d'inhibition de FmhB à une concentration de 15µM alors que son analogue lipide II possède un K_i de 1,2 µM (**Figure 63**). Ce résultat traduit une perte d'affinité d'au moins un facteur 10 de l'enzyme pour son substrat lipidique en absence de GlcNAc. Nous pouvons en conclure que le GlcNAc joue au minimum un rôle essentiel dans l'affinité de FmhB pour son substrat lipidique. Le positionnement du GlcNAc au sein du site catalytique en présence du second substrat reste donc à explorer afin de pouvoir identifier les déterminants

chimiques de FmhB impliqués dans la spécificité de substrats lipide I vs lipide II. L'obtention d'une structure à haute résolution du complexe FmhB:BS avec le motif GlcNAc bien résolu permettrait d'identifier ces déterminants.

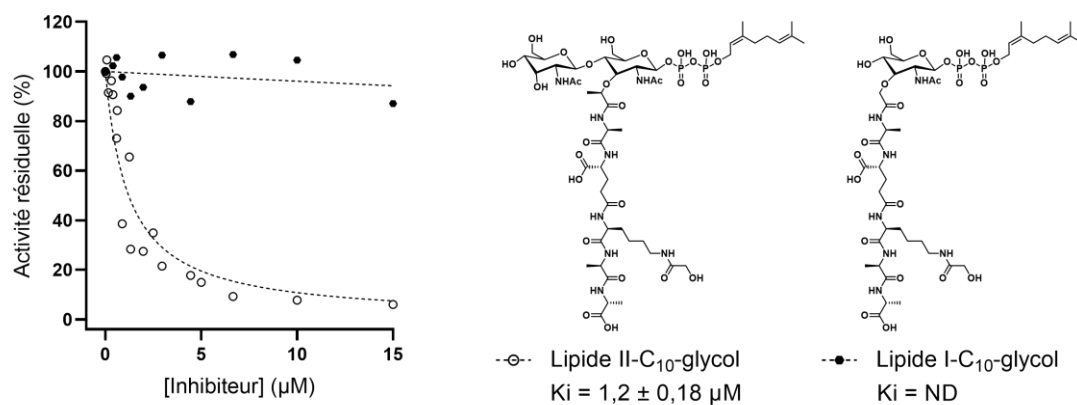


Figure 63 : Impact du GlcNAc sur l'affinité de FmhB pour son substrat lipidique.

4.3.2. Environnement de la L-Ala¹ et du D-iGlu²

Avec le changement de conformation, la T²⁰⁶ qui était à proximité du GlcNAc dans la structure avec le lipide-II-C₁₀, se situe désormais à 3.4 Å du MurNAC mais également à 2.9 Å du groupement acide carboxylique du D-iGlu². Dans la protéine native, la leucine trouvée en position 206 ne possède pas de groupement hydroxyle au niveau de sa chaîne latérale, ce qui modifie probablement les interactions avec le BS 1.

L'analyse de cette région non structurée située à proximité du D-iGlu² n'a pas permis d'identifier de nouveaux résidus potentiels impliqués dans la spécificité de substrat de FmhB pour son substrat non amidé. Les résidus E³⁶⁶ et H³⁶⁷ sont désormais situés chacun à des distances de plus de 6.9 Å, excluant toute interaction avec le D-iGlu² dans cette conformation (**Figure 64**).

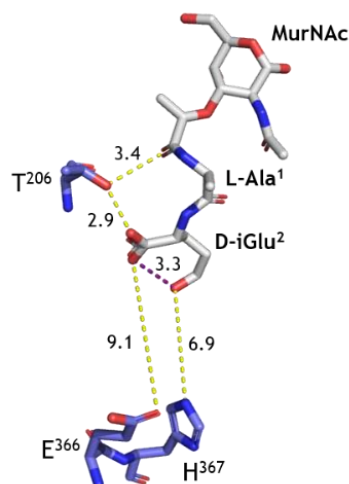


Figure 64 : Environnement de la L-Ala¹ et du D-iGlu².

4.3.3. Positionnement de la L-Cys³

Comme expliqué précédemment, l'obtention de FemX de *W. viridescens* en complexe avec un BS a permis d'obtenir de nombreuses informations structurales sur les changements conformationnels de la protéine. Il a notamment été montré que la présence d'une partie ARN induit une rotation de 129° autour de la liaison entre les carbones α et β du résidu 3 du pentapeptide (**Figure 65A**) (Fonvielle et al., 2013a). La comparaison de nos deux structures de FmhB nous a permis de montrer que ce phénomène de rotation est également observé chez la transférase Fem de *S. aureus* (**Figure 65B**). La fixation de l'ARN pourrait donc également induire ce changement de conformation chez FmhB, et permettre d'orienter le NH₂ de la L-Lys³ du substrat en face de la lysine catalytique afin que la réaction enzymatique puisse avoir lieu.

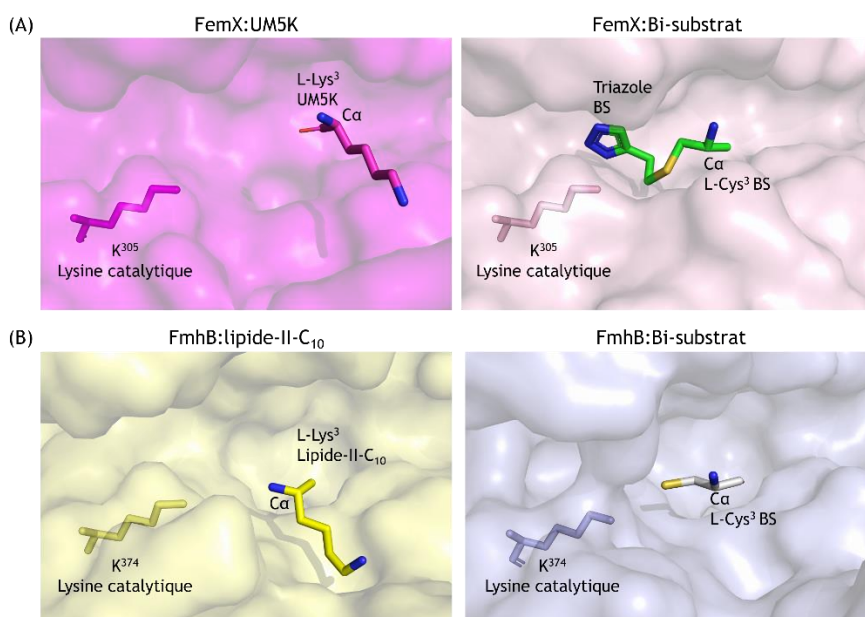


Figure 65 : Rotation de la chaîne latérale du résidu 3 du substrat en présence d'ARN.

(A) Comparaison de l'orientation du résidu 3 du ligand dans le site catalytique de FemX en présence (UM5K : 1P4N) ou absence d'ARN (BS, PDB : 4I19). (B) Comparaison de l'orientation du résidu 3 du ligand dans le site catalytique de FmhB en présence ou absence d'ARN.

4.3.4. Environnement du dipeptide D-Ala⁴-D-Ala⁵ terminal

L'analyse et la comparaison de l'environnement de la D-Ala⁴ et de la D-Ala⁵ des deux structures nous a permis de montrer qu'aucun changement majeur de conformation n'est détecté. Le groupement hydroxyle du résidu Y²¹² est situé à 3.3 Å du groupement acide carboxylique de la D-Ala⁵ (vs 2.6 Å dans la structure avec le lipide II). Y³²⁰ qui interagissait précédemment avec la D-Ala⁴ via l'intermédiaire d'une molécule d'eau, semblerait désormais former une liaison directe avec le groupement acide carboxylique de la D-Ala⁵ (distance de 3.1 Å). Enfin, l'arginine 208 est positionnée de façon à pouvoir former une liaison hydrogène directe avec le groupement carbonyle de la D-Ala⁴ (distance de 3.2 Å) (Figure 66).

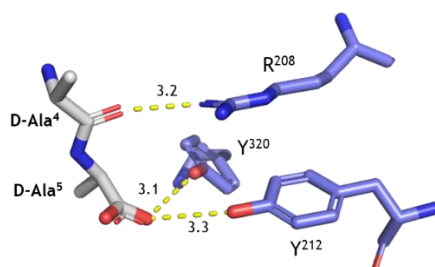


Figure 66 : Positionnement du D-Ala⁴-D-Ala⁵ de la molécule BS 1.

4.3.5. Site probable de fixation du triazole et de l'ARN du BS 1

L'absence de densité électronique suffisamment résolue n'a pas rendu possible le positionnement des nucléotides dans la structure du complexe. Cette absence de densité électronique peut être dû (i) à l'hydrolyse de la partie ARN du BS 1 ou (ii) à la mobilité importante des nucléotides conduisant à un problème de résolution. Néanmoins, le sucre de l'adénosine terminale est relié de manière covalente par un lien triazole à la L-Cys³ du peptide rendant son hydrolyse impossible. Nous devrions donc être en mesure de le détecter dans la carte de densité électronique. De plus, le changement de conformation de la protéine et de l'orientation de la partie lipidique du BS 1, semble indiquer que la partie ARN est présente, bien que non détectable. L'ensemble de ces observations nous laisse penser que l'hypothèse d'une mobilité importante des nucléotides semble la plus probable.

Interaction avec le triazole

Lors de l'étude de la structure de FemX avec son BS, il a été montré que le lien triazole de la molécule BS interagit avec la lysine catalytique K³⁰⁵, et que celle-ci est elle-même stabilisée par deux résidus G²⁹⁰ et L²⁸⁹ (**Figure 67A**). Dans la partie 2.2 de ce chapitre nous avons montré que le motif FxG, stabilisant la lysine catalytique, est conservé au sein des transférases Fem, de même que la géométrie du site catalytique. Lors de l'étude de la structure de FmhB avec le BS 1, nous avons donc retrouvé les résidus F³⁵⁴ et G³⁵⁶ identifiés précédemment qui sont désormais situés à des distances respectives de 4.5 et 2.8 Å du groupement NH₂ de la lysine catalytique K³⁷³ (**Figure 67B**). De plus, la comparaison des sites catalytiques montrée en **Figure 67C** et leurs similarités, pourraient indiquer des interactions similaires entre K³⁷³ de FmhB et le lien triazole du BS.

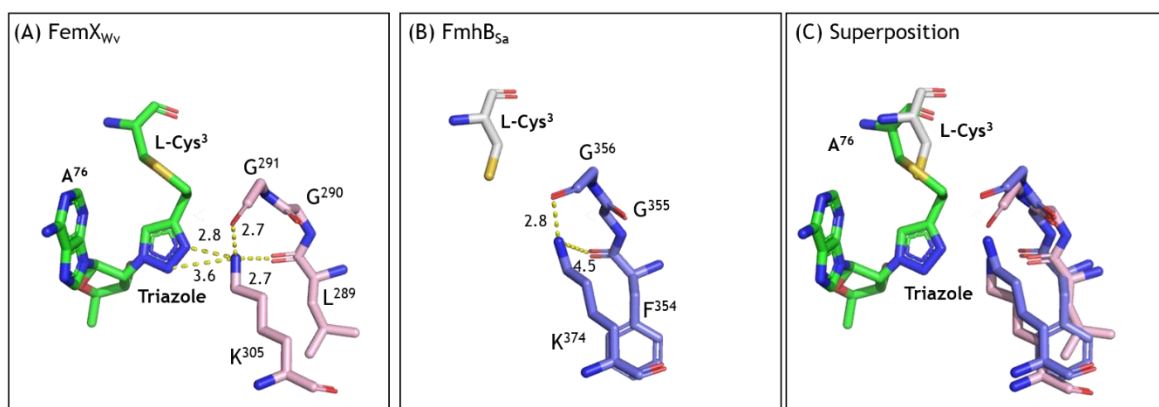


Figure 67 : Positionnement du triazole du BS dans le site catalytique des enzymes.

(A) Interaction du triazole avec les résidus identifiés chez FemX. (B) Site catalytique de FmhB, avec le site probable d'interaction avec le triazole du BS 1. (C) Superposition des deux sites catalytiques des enzymes et de leurs BS. FmhB est représentée en bleu et le BS 1 en blanc, tandis que FemX est colorée en rose et son BS en vert.

Interaction avec l'adénosine terminale A⁷⁶

Lorsque FemX est complexée à un BS, il a été montré que la chaîne latérale de l'isoleucine 208 (I²⁰⁸) change d'orientation et se décale de 2.2 Å afin d'établir une interaction hydrophobe avec l'adénosine terminale de l'ARN (A⁷⁶). Cette adénosine établit également une interaction hydrophobe avec la leucine 301 (L³⁰¹) qui a la même position en présence du BS ou de l'UM5K (**Figure 68A**). Chez FmhB, l'équivalent de I²⁰⁸ de FemX est la phénylalanine 205 (F²⁰⁵). Nous pouvons voir qu'en présence du BS 1, le même phénomène que pour FemX est observé et sa chaîne latérale se décale de 2.6 Å comparée à la structure avec le lipide-II-C₁₀. Le résidu leucine est quant à lui conservé et est en position 370 chez FmhB (L³⁷⁰). Aucune différence de positionnement de ce résidu n'est observée lorsque les structures de FmhB C⁷⁰S L²⁰⁶T en complexe avec le lipide-II-C₁₀ ou le BS 1 sont comparées, tout comme pour FemX avec L³⁰¹ (**Figure 68B**). Le positionnement des résidus F²⁰⁵ et L³⁷⁰ de FmhB laissent supposer un placement différent de celui trouvé chez FemX pour la partie ARN du BS. Néanmoins nous pensons que la base A⁷⁶ pourrait tout de même établir des interactions hydrophobes avec ces deux résidus, bien qu'ils soient seulement situés à 4.5 Å l'un de l'autre (vs 8.6 Å chez FemX).

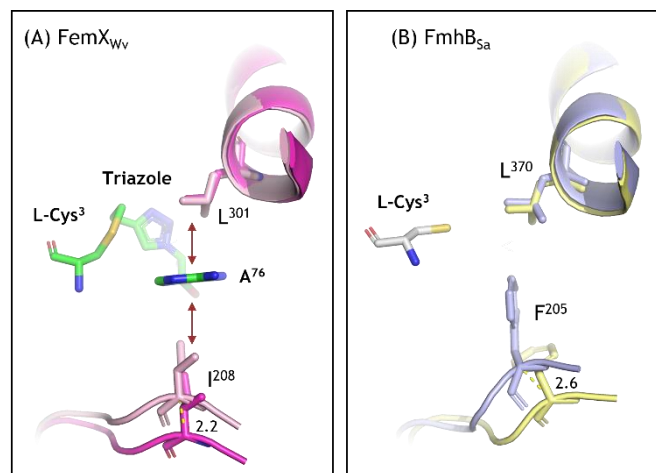


Figure 68 : Positionnement de l'adénosine terminale du BS.

(A) Comparaison des structures de FemX en complexe avec l'UM5K (protéine en rose foncée) ou le BS (protéine en rose clair, et BS en vert). (B) Comparaison des structures de FmhB C⁷⁰S L²⁰⁶T en complexe avec le lipide-II-C₁₀ (protéine en jaune) ou le BS1 (protéine en bleu clair, et BS en blanc).

Interaction avec le nucléotide C⁷⁵

Le positionnement du C⁷⁵ du BS dans la poche catalytique de FemX a également été étudié. Il a été montré que le sucre du C⁷⁵ établit une interaction hydrophobe avec la phénylalanine 304 de la protéine. Chez FmhB la phénylalanine est conservée et se situe en position 373, laissant supposer une interaction similaire avec le sucre du C⁷⁵ du BS 1.

Pour conclure, bien que l'ARN ne soit pas visible dans la structure, nous avons obtenu des informations importantes sur le changement de conformation de l'enzyme ainsi que sur le placement de la partie lipidique du BS 1. Néanmoins nous aimerions obtenir une structure avec une partie nucléotidique visible afin d'obtenir des informations sur le placement de l'ARN dans le site catalytique de FmhB. Dans ce contexte et dans le but d'améliorer la fixation des nucléotides dans le site catalytique, nous avons exploré le potentiel des acides xéno nucléiques (XNA) comme mimes de l'ARN. Ce projet a été mené sur l'enzyme FemX de *W. viridescens* et constitue le chapitre IV.

CHAPITRE IV : Publication 2

Les acides xéno nucléiques comme substrats ou inhibiteurs de FemX de *W. viridescens*.

Durant ma thèse nous avons développé un projet annexe qui a porté sur l'exploration des acides xéno nucléiques (XNA) comme substrats et inhibiteurs de la Fem modèle FemX de *W. viridescens*. Les XNA sont des analogues d'acides nucléiques, modifiés chimiquement. Ces molécules présentent l'avantage de posséder une résistance accrue aux nucléases et d'être plus stables sous forme de duplex et d'améliorer les interactions avec les protéines. Ces propriétés font des XNA des outils intéressants pour le développement d'inhibiteurs de haute affinité, plus stables et ne pouvant pas être dégradés dans le cytoplasme bactérien.

Nous avons choisi d'étudier 3 types de XNA pour essayer d'améliorer les caractéristiques de nos inhibiteurs et comprendre l'impact de la modification des riboses sur la fixation à la protéine. Nous avons choisi de remplacer les riboses par des motifs 1',5'-anhydrohexitol (HNA), 2'-fluoro ribose (2'-F-RNA), et 2'-fluoro arabinose (2'-F-ANA). Le motif HNA comporte un groupement méthylène (CH₂) inséré entre l'oxygène et le carbone lié à la nucléobase menant à la formation d'un cycle à 6 atomes doté d'une grande stabilité chimique. Les résidus HNA sont connus pour mimer l'ARN. Les motifs 2'-F-RNA ou 2'-F-ANA possèdent un atome de fluor (F) en position 2' du ribose respectivement au-dessus ou en dessous du plan du cycle du ribose. Les 2'-F-RNA et 2'-F-ANA sont connus pour mimer respectivement l'ARN ou l'ADN (**Figure 69**).

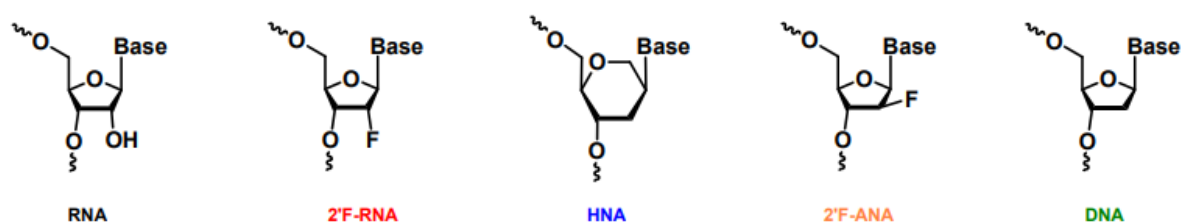


Figure 69 : XNA étudiés comme substrats et inhibiteurs de FemX de *W. viridescens*.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à l'impact sur FemX de l'incorporation des XNA (i) dans le bras accepteur de l'Ala-ARNt^{Ala} (substrat de FemX) et (ii) dans nos molécules bi-substrats (inhibiteurs de FemX). Ce travail fait l'objet d'une publication acceptée et en cours de révision chez Nucleic Acids Research (NAR) qui constituera ce chapitre.

Résumé de la publication :

Les XNA offrent un important potentiel pour la biologie synthétique, la biotechnologie et la médecine moléculaire en raison de leurs propriétés, cependant leur capacité à mimer les acides nucléiques restent encore à explorer. Afin d'étudier la capacité des XNA à mimer l'ARNt, nous avons synthétisé trois analogues de L-Ala-ARNt^{Ala}.

La première partie de ce travail a consisté à synthétiser des microhélices analogues d'Ala-ARNt^{Ala} à base de XNA. Nous avons montré que les analogues L-Ala-XNA à base de HNA et 2'F-RNA sont utilisés aussi efficacement par FemX qu'une microhélice « substrat naturel » Ala-ARNt^{Ala}. En revanche aucune activité n'a été détectée pour les analogues d'Ala-XNA^{Ala} contenant des motifs 2'F-ANA ou ADN. De façon à comprendre cette spécificité de substrat, nous avons synthétisé des molécules inhibitrices de type BS possédant les mêmes types de modifications. Nous avons montré que l'introduction de nucléotides 2'F-ARN dans un BS améliore les capacités d'inhibition de FemX. Ce résultat traduit une meilleure affinité de l'affinité de l'enzyme pour la molécule composée de 2'F-ARN.

Pour avancer dans la compréhension des mécanismes enzymatiques responsables de ces différences d'activité ou d'affinité de FemX pour les différentes molécules, une étude cristallographique a été entreprise. L'obtention de structures cristallines de FemX en complexe avec les différents BS a permis d'étudier le positionnement des différents types de XNA dans le site catalytique de l'enzyme. Nous avons montré que la géométrie des sucres des BS à ADN et 2'F-ANA déstabilise et désorganise le positionnement de la partie acide nucléique dans le site actif de FemX permettant d'expliquer pourquoi les microhélices aminoacylées à ADN et 2'F-ANA ne sont pas reconnues comme substrats de FemX. Nous avons également pu montrer que, bien que mimant géométriquement les riboses de l'ARN, les nucléotides à HNA étaient moins bien fixés au niveau du site catalytique de l'enzyme à cause de la perte de l'hydroxyle en position 2'. Nous avons également montré que l'introduction d'un résidu 2'F-RNA en position C⁷⁵ de la partie ARN d'un BS permet d'augmenter significativement l'interaction de la molécule avec le résidu F³⁰⁴ de la protéine en formant une interaction de type « lone-pair Pi stacking ».

Cette étude a permis de mettre en évidence que l'introduction de 2'F-RNA dans la partie acide nucléique d'un BS peut permettre d'améliorer sa fixation dans le site catalytique d'une transférase Fem. Cette caractéristique ouvre des perspectives intéressantes pour obtenir des structures à haute résolution de FmhB en complexe avec un BS comportant des résidus XNA.

Amino-acyl tXNA as inhibitors or amino acid donors in peptide synthesis

Lauriane Rietmeyer^{1,†}, Inès Li De La Sierra-Gallay^{2,†}, Guy Schepers³,
Delphine Dorchêne¹, Laura Iannazzo⁴, Delphine Patin², Thierry Touzé²,
Herman van Tilbeurgh², Piet Herdewijn³, Mélanie Ethève-Quellejeu^{4,*} and
Matthieu Fonvielle^{1,*}

¹INSERM UMR-S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université, Université Paris Cité, F-75006 Paris, France, ²Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay 91198, Gif-sur-Yvette, France, ³Laboratory of Medicinal Chemistry, Rega Institute for Biomedical Research, KU Leuven, Herestraat 49, Box 1041, 3000 Leuven, Belgium and ⁴Université Paris Cité, CNRS UMR 8601, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, F-75006 Paris, France

Received July 21, 2022; Revised October 17, 2022; Editorial Decision October 18, 2022; Accepted October 21, 2022

ABSTRACT

Xenobiotic nucleic acids (XNAs) offer tremendous potential for synthetic biology, biotechnology, and molecular medicine but their ability to mimic nucleic acids still needs to be explored. Here, to study the ability of XNA oligonucleotides to mimic tRNA, we synthesized three L-Ala-tXNAs analogs. These molecules were used in a non-ribosomal peptide synthesis involving a bacterial Fem transferase. We compared the ability of this enzyme to use amino-acyl tXNAs containing 1',5'-anhydrohexitol (HNA), 2'-fluoro ribose (2'F-RNA) and 2'-fluoro arabinose. L-Ala-tXNA containing HNA or 2'F-RNA were substrates of the Fem enzyme. The synthesis of peptidyl-XNA and the resolution of their structures in complex with the enzyme show the impact of the XNA on protein binding. For the first time we describe functional tXNA in an *in vitro* assay. These results invite to test tXNA also as substitute for tRNA in translation.

INTRODUCTION

Although chemically modified nucleic acids have long been studied, xenobiotic nucleic acid (XNA) methodology has only recently been introduced, offering new applications in synthetic biology (1). XNAs are chemically modified nucleic acids, of which most have modified carbohydrate moieties and for which the chemistry can be tuned depending on the biological application. In most cases, the chemical modification increases nuclease resistance (2) and improves duplex stability of the XNA (3). In the field of synthetic biology,

XNAs have been mainly tested as substitutes for DNA to store and transfer information (4), as aptamers (5,6), and to substitute RNA in biocatalysis (7).

Transfer RNAs are central compounds for the decoding of RNA and bacterial cell-wall synthesis. Here, we investigated the synthesis and function of a tXNA (transfer-XNA) in the context of a tRNA-dependent Fem transferase reaction. The use of tXNA substrates in the reaction represents a new step in the development of synthetic biology based on XNA.

The hexitol nucleic acid (HNA) system provides a noteworthy example of modified oligonucleotide analogs with improved characteristics. HNAs contain the six-membered sugar 1',5'-anhydro-D-arabino-hexitol instead of the furanose moiety (Figure 1) (2). The 1',5'-anhydrohexitol nucleoside mimics the natural furanose nucleoside in its 3'-endo conformation, resulting in the axial orientation of the base moiety (8). This feature makes it possible to conformationally pre-organize the single strand HNA oligonucleotide in an A-form, which has been shown to form stable self-complementary duplexes, as well as sequence-selective stable hetero-duplexes with natural DNA and RNA. The A-form character of HNA has been confirmed by NMR studies of a HNA oligomer bound to a complementary RNA oligomer (9) and by X-ray crystallography (10,11). This observation was recently confirmed by studies of a complex between HNA-modified DNA oligonucleotides and an archaeal DNA-polymerase obtained by directed evolution (12). Thus, HNA appears to be a mimic of RNA but has never been used as a functional RNA involving protein catalysis. In the present study, we aimed to evaluate its suitability for the construction of a tXNA.

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 169084106; Email: matthieu.fonvielle@inserm.fr

†Contributed equally to this work.

Present address: Matthieu Fonvielle, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

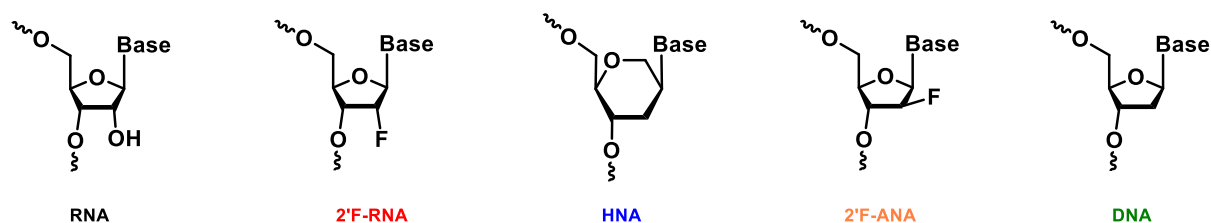


Figure 1. Nucleic acids and xeno-nucleic acids used in this study. RNA: ribonucleic acids (RNA), 2'-deoxy-2'-fluoro ribonucleic acids (2'-F-RNA), 1',5'-anhydrohexitol nucleic acids (HNA), 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinonucleic acid (2'-F-ANA), deoxyribonucleic acids (DNA).

Other XNAs have been designed by replacing the 2' OH group of RNA or the 2' H atom of DNA with a fluorine atom (13). The small size of the fluorine substitution leads to minimal steric perturbation in duplex structure formation (14–19). The fluorine can be positioned down or up to the 5-membered cycle (Figure 1), leading to 2'-deoxy-2'-fluoro-ribose (2'-F-RNA) as an RNA mimic or 2'-deoxy-2'-fluoro-arabinose (2'-F-ANA) as a DNA mimic. The introduction of 2'-Fluoro-RNA residues is known to stabilize duplexes by enhancing the hydrogen bond strength in Watson-Crick type interactions and promoting stacking interactions between bases (20). The high similarity in geometry to RNA (21), the lack of an immunostimulatory effect of fluoro-RNA residues (21), and the increased stability against RNase (22) make fluoro-RNA an interesting class of XNAs for the design of new bioactive molecules.

In this study, we explored the impact of the XNA modification in aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) analogs using HNA or fluoro-RNAs. Aa-tRNAs are substrates of the ribosomal machinery in the synthesis of proteins and are also used in non-ribosomal protein synthesis (NRPS) such as the synthesis of the bacterial cell wall of gram-positive bacteria by Fem transferases (Supplementary Scheme 1) (23), protein degradation by L/F transferases (24), and the modification of bacterial membranes by phosphatidylglycerol synthase (25). Aa-tRNAs are also involved in the synthesis of secondary metabolites, such as cyclodipeptides (26) and natural antibiotics (27).

In our study, we use the Fem transferase enzyme as a model of non-ribosomal peptide synthesis to explore the potential of tXNA analogs. Fem transferases use aa-tRNAs to form branched peptides of the bacterial cell wall peptidoglycan synthesis (see supplementary section 1 and Scheme S1 for details).

We focused on the impact of the incorporation of XNA into the acceptor arm of Ala-tRNA^{Ala}, the substrate of the transferase FemX (Figure 2A). In previous studies, we synthesized analogs of L-Ala-tRNA^{Ala} as substrates of FemX (28) following a strategy described by the group of Hecht (29), which involves the synthesis of aminoacyl-dinucleotides, an enzymatic ligation, and a final deprotection step of the alanine residue (Figure 2B and C). More recently, we synthesized peptidyl-RNA conjugates to obtain high-affinity inhibitors. These peptidyl-RNA conjugates are bi-substrate type analogs in which a peptidoglycan fragment and a RNA moiety are covalently linked by a 1,4-triazole ring. The key chemical step to obtain these molecules is a copper-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) between a 2'-azido oligonucleotide (24-nt RNA)

and an alkyne-UDP-MurNac-pentapeptide precursor (Figure 3A). These peptidyl-RNA conjugates have shown high inhibitory activity when tested on FemX from *W. viridescens* (30) or FmhB from *S. aureus* (31). Modification of these bi-substrate analogs containing a shorter oligonucleotide (8-nt RNA, Figure 3B) allowed us to solve the first crystallographic structure of a FemX-bi-substrate complex and to identify the protein residues involved in RNA binding and enzymatic transfer (32). Here, we investigated which ribose modifications are tolerated by the NRPS process catalyzed by FemX and we studied the structural features involved in the recognition of XNA fragments by the enzyme.

MATERIALS AND METHODS

Enzyme production and purification

FemX, alanyl-tRNA synthetase, T4 RNA ligase, MurC, MurD, MurE and MurF were produced and purified as previously described (31,32). Protein concentration was determined by the Bradford assay (Biorad) using BSA as a standard.

tRNA production and purification

tRNA^{Ala} (5'-GGGGCCUUAAGCUCAGCUGGGAGA GCGCCUGCUUUGCACGCAGGAGGUCAGCGG UUCGAUCCGCUAGGCCUCCACCA-3'), corresponding to 76 nt of tRNA^{Ala} of *E. faecalis* strain V583, was obtained by *in vitro* transcription using T7 RNA polymerase (35).

Purification of nucleotide precursors from bacterial extracts

UM5K 5 was purified from vancomycin-susceptible *S. aureus* strain RN4220 as previously described with minor modifications (32) (Supplementary information).

Ligation of *N*-pentenoyl-L-alanyl-dinucleotide (pdCpA-2'-L-Ala-pentenoyl) to 22-nt helices and iodine mediated L-alanyl deprotection

Modified dinucleotide pdCpA-L-Ala-pentenoyl was synthesized, ligated to helices 6a to 11a using purified T4 RNA ligase, and deprotected with iodine (36,37) (for details, see supplementary information section 7).

FemX activity in the presence of Ala-tXNAs

The efficiency of the L-alanyl transfer catalyzed by FemX using our tXNA analogs (containing RNA, 2'-F-RNA,

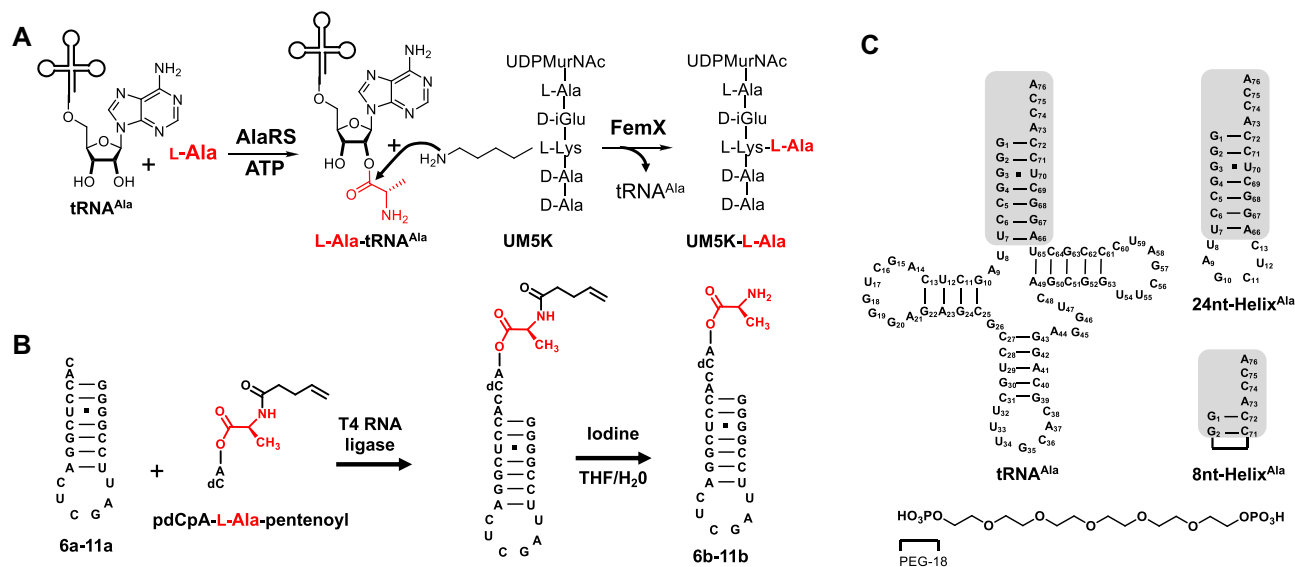


Figure 2. (A) Schematic representation of the reaction catalyzed by the alanyl synthetase (AlaRS) which incorporates the L-Ala onto the tRNA^{Ala} and the reaction catalyzed by FemX which transfers the L-Alanyl residue from tRNA^{Ala} to UDP-MurNac-pentapeptide (UM5K). (B) Schematic representation of the hemi-synthesis of L-Ala-Helix^{Ala} used in this study (C) Structure of tRNA^{Ala} and the 24- and 8-nt helices that mimic the acceptor arm of tRNA^{Ala}. Acceptor arm positions are highlighted in gray.

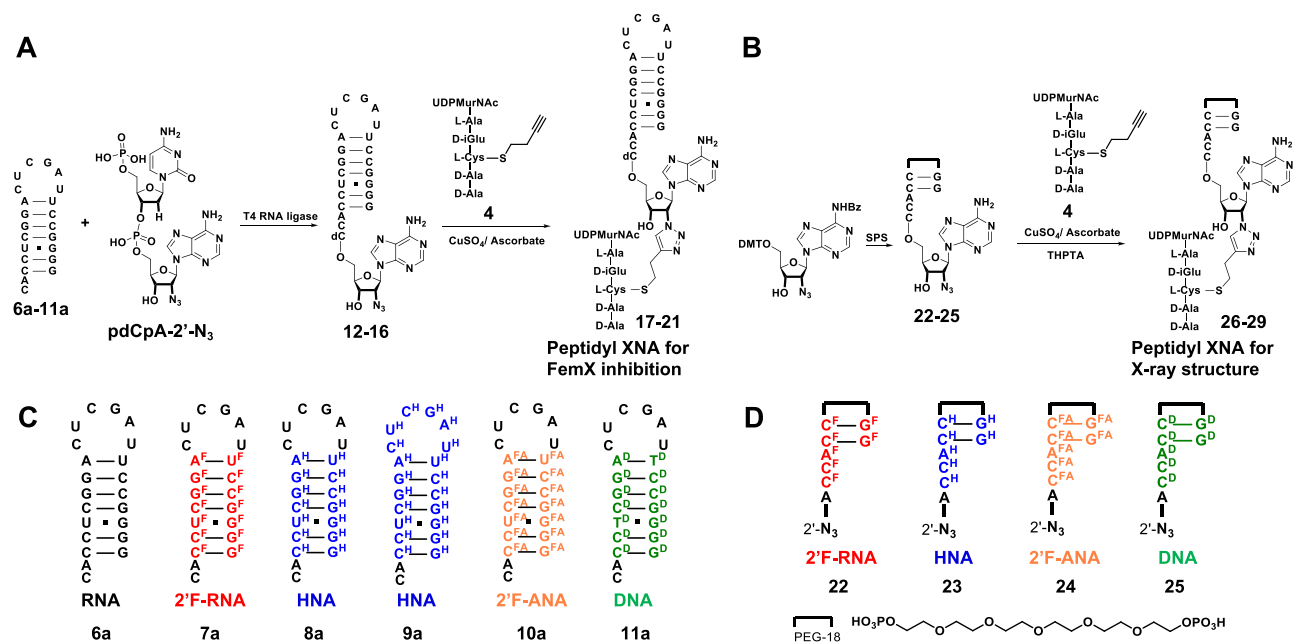


Figure 3. (A) Chemical strategy for the synthesis of the 24-nt peptidyl-oligonucleotide bi-substrate analog. (B) Chemical strategy for the synthesis of the 8-nt peptidyl-oligonucleotide bi-substrate analogs. (C) Helices mimicking the acceptor arm of tRNA^{Ala} used in this study. (D) 8-nt helices mimicking the terminal part of the acceptor arm of tRNA^{Ala}. A, G, C and U are RNA (black). A^F, G^F, C^F and U^F are 2'-F-RNA (red). A^{FA}, G^{FA}, C^{FA} and U^{FA} are 2'-F-ANA (orange). A^H, G^H, C^H and U^H are HNA (blue). A^D, G^D, C^D and U^D are DNA (green).

HNA, 2'-F-ANA or DNA nucleotides) was determined at 21°C in 20 μ l of 50 mM ammonium acetate (pH 7.2). After 0, 15, 30, 60, 120, 300 and 1100 min, an aliquot of each reaction mixture was quenched by the addition of an acetic acid solution (0.1%) containing an internal standard of the reaction product, [¹³C-¹⁵N]-L-Ala-UDP-MurNac-pentapeptide for quantification of the transfer. The velocity of the transfer of the L-alanyl residue from

6b, 7b, 8b, 9b, 10b and 11b to UDP-MurNac-pentapeptide was calculated using the linear portion of the curves between 0 and 30 min (Insets in Figure 4). Transfer efficiencies (TE) are expressed in min⁻¹ and were calculated by dividing the velocity of each reaction by the final product concentration determined at 1100 min (Supplementary information section 8) to avoid bias arising from differences in substrate concentrations from the steps of ligation.

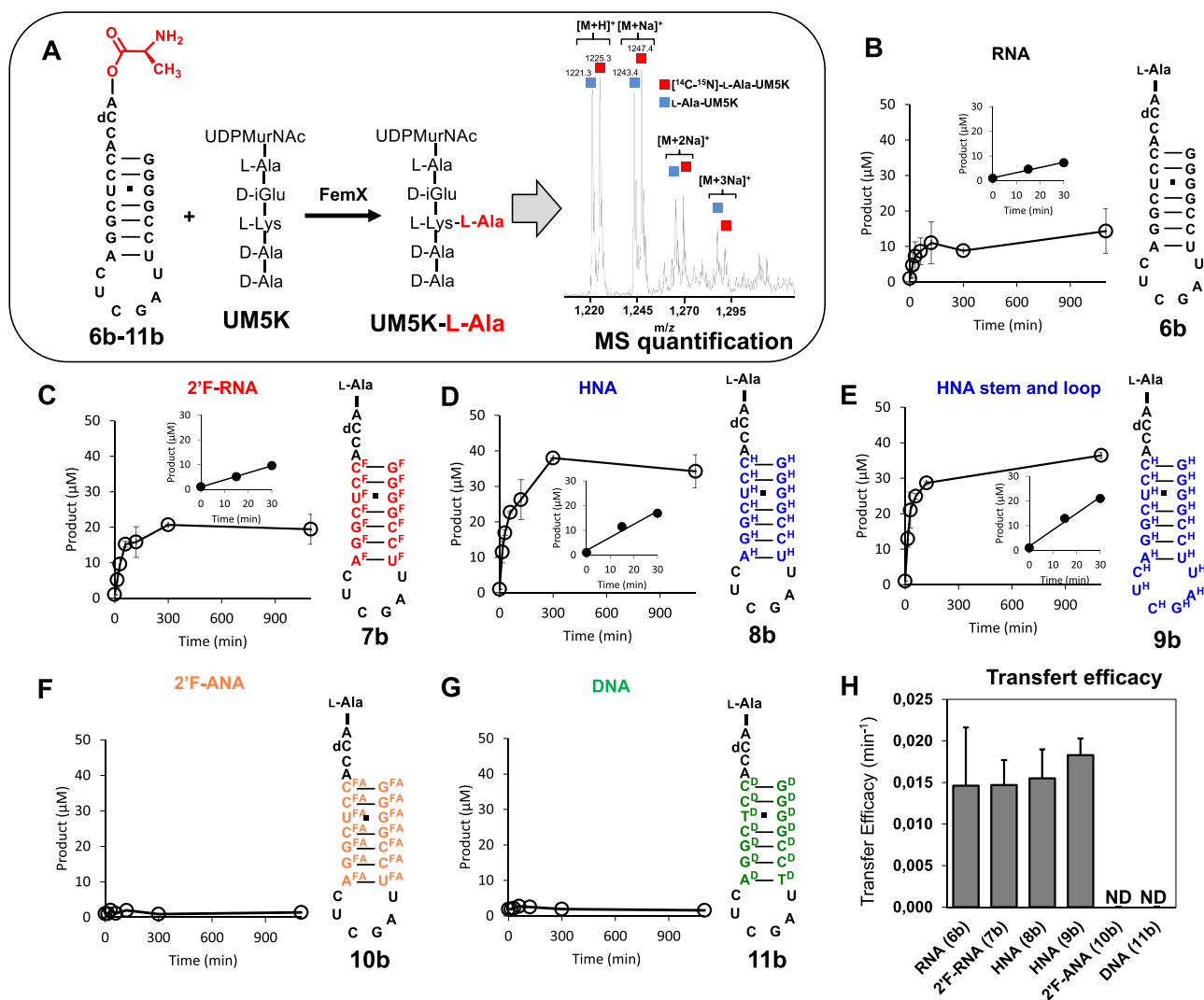


Figure 4. (A) Semi-synthesis of L-Ala-tRNA^{Ala} analogs. Kinetics of the transfer of L-Ala from L-Ala-helices and quantification by mass spectroscopy (Supplementary information). Transfer from RNA (B) 2'F-RNA (C), HNA (D and E), 2'F-ANA (F), or DNA (G). (H) Transfer efficacy of L-Ala from helices 6b-11b to UM5K by FemX. ND: not detected.

tion, deprotection, and precipitation of the amino-acylated helices.

Synthesis of the alkyne-containing UDP-MurNAC-peptide analogue

Semi-synthesis of the UDP-MurNAC-peptide analogue 4 was performed as previously described (30) (See Supplementary information section 7 and scheme S2 for details).

Synthesis of 24-nt tXNA bi-substrate inhibitors

The convergent synthesis of XNA-containing bi-substrates 17, 18, 19, 20 and 21 (Figure 3A) was based on a CuAAC reaction between alkyne UDP-MurNAC-pentapeptide 4 and 2'-azido XNA-containing oligonucleotide helices 12, 13, 14, 15 and 16. The 2'-Azido-dinucleotide pdCpA-2'-N₃ was synthesized and ligated to helices 7a, 8a, 9a, 10a and 11a using purified T4 RNA ligase (30), with minor modifications (Supplementary information). The resulting 2'-azido

helices 12, 13, 14, 15 and 16 were purified by anionic-HPLC and analyzed by HPLC, mass spectrometry (Supplementary information), and denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (Supplementary Figure S1 in Supplementary information). Alkyne-containing UDP-MurNAC-peptide 4 was obtained by semi-synthesis using Mur enzymes from *E. coli* (30). The expected bi-substrates 17, 18, 19, 20 and 21 were purified and analyzed by anionic-HPLC and mass spectrometry (Supplementary information).

Synthesis of 8-nt tXNA bi-substrate inhibitors

The 2'-azido-adenosine (A⁷⁶) at the 3'-extremity of each 8-nt oligonucleotide was introduced by solid-phase synthesis. The 2'-azido-adenosine moiety was used to react with the alkyne containing UDP-MurNAC-pentapeptide 4, affording compounds 26 (2'F-RNA), 27 (HNA), 28 (2'F-ANA) and 29 (DNA) (Figure 6A). Production of the resin substituted by the 2'-azido nucleotide, the coupling reac-

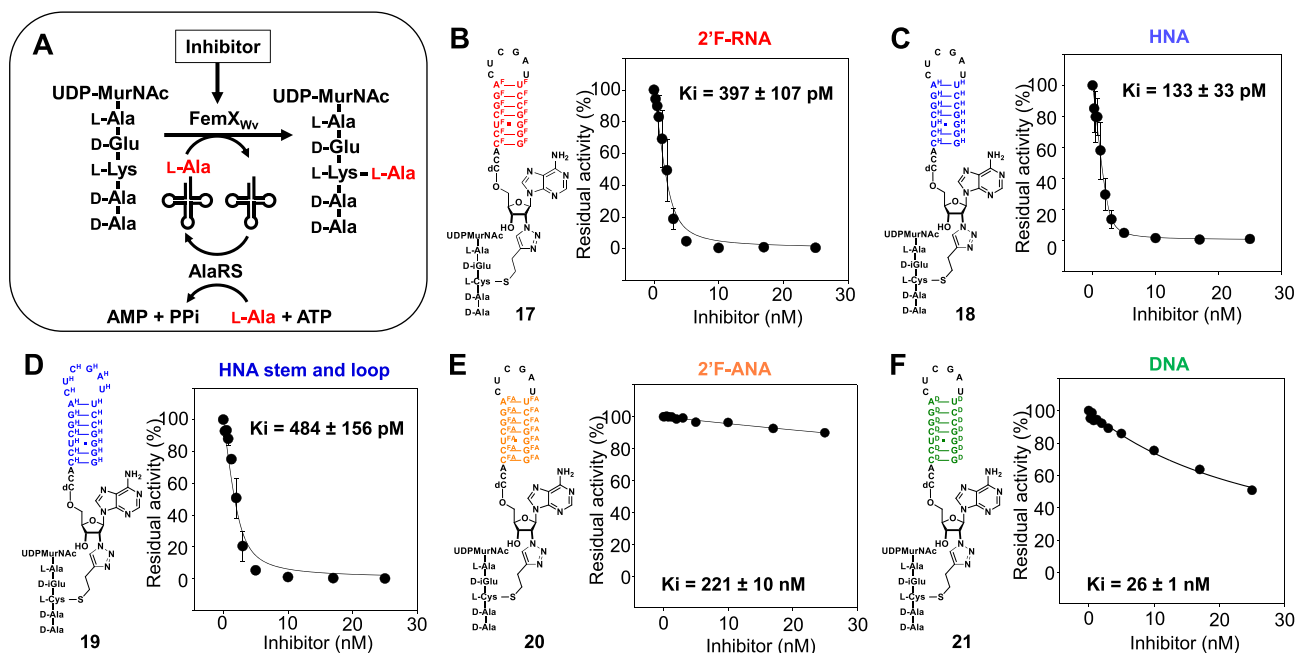


Figure 5. (A) Inhibition of FemX by peptidyl-oligonucleotide conjugates containing 2'F-RNA residues in the helix stem (B), HNA residues in the helix stem (C), HNA residues in the helix stem and loop (D), 2'F-ANA residues in the helix stem (E) and DNA residues in the helix stem (F). K_i values were calculated by fitting the Morrison equation to the data.

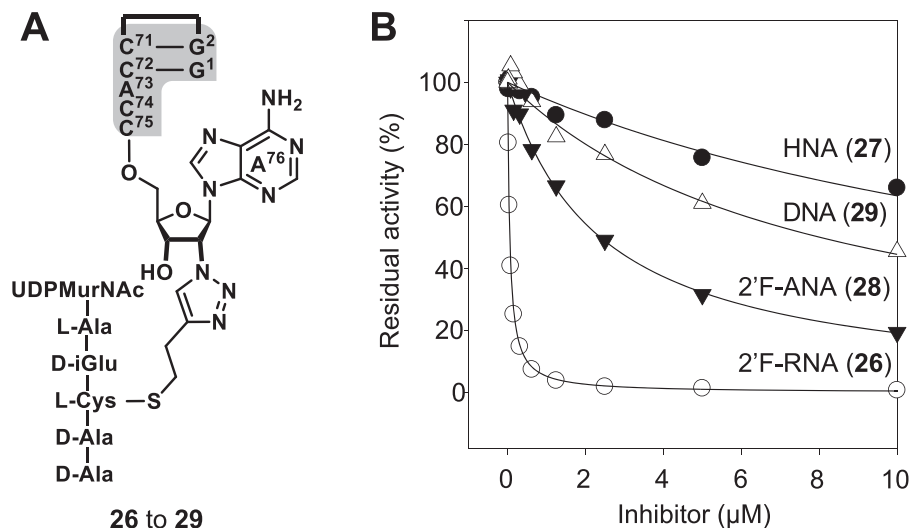


Figure 6. Inhibition of FemX by 8-nt peptidyl-oligonucleotide conjugates. (A) General structure of the 8-nt peptidyl-oligonucleotides (in gray: RNA or XNA). (B) Inhibition curves of compounds 26 (2'F-RNA), 27 (HNA), 28 (2'F-ANA) and 29 (DNA).

tions, and the final deprotection step were performed as previously described (31). Compounds 26, 27, 28 and 29 were purified and analyzed by mass spectrometry (Supplementary information section 11) and anionic-HPLC (Supplementary information section 12).

K_i determination

Inhibition of FemX was tested in a radioactive coupled assay involving [¹⁴C]-L-Ala acylation of tRNA^{Ala} by alanyl tRNA synthetase (AlaRS) and transfer of [¹⁴C]-L-Ala

from the resulting [¹⁴C]-L-Ala-tRNA^{Ala} to UDP-MurNAC-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys-D-Ala (UM5K) to form UDP-MurNAC-L-Ala-γ-D-Glu-L-Lys([¹⁴C]-L-Ala)-D-Ala-D-Ala ([¹⁴C]-L-Ala-UM5K) (Supplementary information section 8) (32).

FemX crystallization, data collection, structure determination and refinement

FemX (255 μM) in complex with peptidyl-XNA 26 to 29 (306 μM) was co-crystallized by sitting-drop vapor

diffusion (Supplementary information). The structures of the complexes were solved by the molecular replacement method at 1.77 Å (HNA), 1.80 Å (2′F-RNA), 1.34 Å (2′F-ANA) and 1.49 Å (DNA) resolution. All complexes include the 337 residues of the protein (see Supplementary information and Supplementary Table S1 for crystal structure determination, data collection and refinement statistics).

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical synthesis of Ala-tXNA^{Ala} as an analog of Ala-tRNA^{Ala}

The study of the impact of XNAs on biological systems has been hampered by the difficulties of their synthesis. Although great progress has been made in recent years to obtain XNA-specific polymerases by directed evolution, the enzymatic synthesis of XNAs in significant quantities is still challenging (33,34). Solid-phase synthesis techniques have improved the synthesis of XNA but do not allow the synthesis of large oligonucleotides. Here, we show that an enzymatic ligation catalyzed by T4 RNA ligase between an L-Ala-acylated dinucleotide and an XNA can be used to obtain tXNA^{Ala} analogs. As FemX interacts mainly with the acceptor arm of tRNA^{Ala}, we restricted the size of our XNA probes to 24-nt aminoacylated helices as mimics of the tRNA^{Ala} (35). For this study, we synthesized six helices of 24-nt mimicking the acceptor arm of tRNA^{Ala} (Figure 3C) containing RNA, 2′F-RNA, HNA, 2′F-ANA or DNA, nucleotides in the double stranded portion of the helices (compounds **6a**, **7a**, **8a**, **10a** and **11a**) or HNA in the full helix (compound **9a**). The RNA and DNA helices (**6a** and **11a**, respectively) were synthesized by the phosphoramidite method and purified by anion-exchange chromatography (DNAPac). The XNA helices containing 2′F-RNA, HNA, and 2′F-ANA nucleotides (**7a**, **8a**, **9a**, **10a**) were obtained by solid phase synthesis on an Expedite® 8909 DNA synthesizer (Supplementary information). The acylated dinucleotide (pdCpA-L-alanyl-pentenoyl, Figure 2B) was synthesized (36) and ligated to helices **6a** to **11a** using purified T4 RNA ligase and precipitated using cold ethanol (37). Iodine-mediated L-alanyl deprotection was performed to obtain substrate analogues **6b** to **11b** (29) (Figure 2B).

Transfer efficiency of the amino-acid from Ala-tXNAs

Compounds **6b** to **11b** were used as substrates in an *in vitro* assay to compare the transfer efficiency (TE) of the alanyl residue catalyzed by the enzyme (Figure 4A). We observed similar alanyl transfer in a time-dependent manner with compound **6b** containing natural RNA residues, compound **7b** (2′F-RNA) and compound **8b** (HNA) (TE = 0.015 ± 0.007, 0.015 ± 0.003 and 0.016 ± 0.003 min⁻¹, respectively, Figure 4B–D). The introduction of HNA nucleotides in both the double strand and loop, compound **9b** (Figure 4E) had also no effect on the efficiency of the alanyl transfer compared to the natural RNA (TE = 0.018 ± 0.002 min⁻¹). On the contrary, alanyl transfer from compounds **10b** (2′F-ANA) and **11b** (DNA) was abolished, as we did not detect any product of the reaction by mass spectrometry, even after 1,100 min (Figure 4F and G). These results (Figure 4H) indicates that helices

containing HNA or 2′F-RNA are substrates of FemX and 2′F-ANA or DNA in the double strand are unable to sustain the activity of Fem transferase, even if the single-strand terminal part (ACdCA) of the substrates is unmodified.

Synthesis and biological evaluation of helix-based tXNA bi-substrates

Our next objective was to synthesize peptidyl-XNA conjugates as FemX bi-substrate analogs and measure the impact of XNA incorporation in peptidyl-RNA conjugates on the binding of FemX. The peptidyl-XNAs (**17** to **21**) were synthesized in two steps starting from 2′-azido-2′-deoxy-dinucleotides (pdCpA-N₃) (**30**). First, the 2′-azido-dinucleotide was ligated to helices **7a** to **11a** to afford azido-tXNA **12** to **16** (Figure 3A). The second step used the CuAAC between the azido-tXNA and the alkyne-UDP-MurNAC (compound **4**) to obtain peptidyl-XNAs **17** to **21** (Figure 3A). We have previously shown that the peptidyl UDP-MurNac-peptide (UM5K) and the RNA helix mimicking the acceptor arm of the tRNA^{Ala} both contribute to high-affinity binding to FemX (30). Inhibition experiments were performed using a coupled enzymatic assay that relies on the aminoacylation of tRNA^{Ala} by the alanyl-tRNA synthetase (AlaRS) and the transfer of the L-alanyl residue from the resulting Ala-tRNA^{Ala} to UM5K by FemX (Figure 5A) (38,39). Compound **17**, which contains 2′F-RNA nucleotides in the double stranded portion of the helix, inhibited FemX, with a K_i of 397 ± 107 pM (Figure 5B), which is in the same order of magnitude to the K_i observed for the inhibition of FemX by peptidyl-RNA (89 ± 10 pM) (30). The introduction of HNA residues in the double strand (compound **18**, Figure 5C) also resulted in inhibition of the same order of magnitude, with a K_i of 133 ± 33 pM. The addition of HNA residues in the helix loop (compounds **19**, Figure 5D) decreased the inhibition of FemX, with a K_i of 484 ± 156 pM. These results show that the introduction of HNA residues in the double strand of the helix did not impact inhibition but that the introduction of HNA in both the double strand and the loop of the helix slightly decreases the inhibition of FemX. Finally, compounds **20** and **21** (Figure 5E and F), containing 2′F-ANA and DNA nucleotides in the double strand of the helix, showed a 2,500-fold (K_i = 221 ± 10 nM) and 300-fold (K_i = 26 ± 1 nM) reduction of inhibition, respectively. These results unambiguously show that the introduction of 2′F-ANA or DNA nucleotides has a deleterious effect on the formation of a stable complex between FemX and the peptidyl-XNA inhibitors.

Synthesis and biological evaluation of minimal peptidyl-tXNA bi-substrate inhibitors for co-crystallization

To study the impact of XNA in the 3′-terminal ACCA part of tRNA^{Ala} we synthesized minimal bi-substrate analogs fully modified by XNA nucleotides (compounds **26** to **29**, Figure 3B). To mimic the terminal part of the acceptor arm of tRNA^{Ala} we chose 8-nt XNA oligonucleotides (Figure 3D), as similar compounds were successful to obtain the crystallographic structure of Fem transferase enzymes in the presence of peptidyl-RNA (32). The synthe-

Table 1. Calculated K_i values deduced by fitting the Morrison equation to the data. Gibbs free enthalpies ΔG° were calculated using the equation $\Delta G^\circ = -RT\ln(K_i)$, with $R = 1.987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ and $T = 303.15 \text{ K}$

Compound composition	K_i (μM)	ΔG° (kcal mol ⁻¹)	$\Delta\Delta G^\circ$ (kcal mol ⁻¹)
RNA ^(a)	0.93 ± 0.07	-8.37	NA
2′F-RNA (26)	0.056 ± 0.002	-10.05	-1.68
HNA (27)	17 ± 1	-6.60	+1.77
2′F-ANA (28)	2.4 ± 0.1	-7.80	+0.57
DNA (29)	8.0 ± 0.6	-7.07	+1.30

(a) 8-nt peptidyl-RNA (**32**).

sis of the 8-nt helices (compounds **22** to **25**) was performed by SPS, starting from the 2′-azido 2′-deoxyadenosine attached to a solid support (Figure 3B). A polyethylene glycol linker was incorporated into each oligonucleotide to stabilize the base pairing necessary to conserve good recognition with the enzyme (**32**) (Figure 3D). Finally, azido-oligonucleotides **22** to **25** were reacted with alkyne containing UDP-MurNAc-pentapeptide **4** through a CuAAC reaction, affording compounds **26** (2′F-RNA), **27** (HNA), **28** (2′F-ANA) and **29** (DNA) (Figure 6A). These short peptidyl-XNAs were tested as inhibitors of FemX (Figure 6B and Table 1). HNA-based molecule **27** inhibited FemX 19-fold less than the peptidyl-RNA analog ($K_i = 17 \pm 1 \mu\text{M}$ and $0.93 \pm 0.07 \mu\text{M}$, respectively). Compounds **28** (2′F-ANA) and **29** (DNA) inhibited FemX moderately less than the RNA analog: 2.6-fold ($K_i = 2.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$) and 8.7-fold ($K_i = 8.0 \pm 0.6 \mu\text{M}$), respectively. Interestingly, 2′F-RNA based molecule **26** is the best inhibitor of FemX ($K_i = 0.057 \pm 0.002 \mu\text{M}$) compared to $0.93 \pm 0.07 \mu\text{M}$ obtained for the peptidyl-RNA. These results show that the XNA residues present in the 3′ terminal single-strand portion of the bi-substrate affect ligand binding in the catalytic site of the enzyme. We thus undertook to co-crystallize the four bi-substrate analogs **26** to **29** with the protein to investigate structural determinants that could explain these inhibition variations.

Structural studies of short peptidyl-tXNA bi-substrates in complex with FemX

We determined the crystal structure of FemX bound to compounds **26**, **27**, **28** and **29** (Figure 7). Complex crystals were grown under conditions similar to those used to obtain the complex with our first 8-nt peptidyl-RNA (PDB: 4II9).

Analysis reveals that in the four complexes, the enzyme structure is almost identical to that in the complex with a peptidyl-RNA. R.M.S.D. values between the RNA-based complex and the complexes with compound **26** (2′F-RNA), **27** (HNA), **28** (2′F-ANA) and **29** (DNA) were 0.204, 0.131, 0.144 and 0.116 Å, respectively (including all residues, Supplementary Figure S2). The only minor conformational change observed consisted of a 1.8 Å shift of the Met²⁶⁰-Thr²⁶⁴ loop (Supplementary Figure S2) for the two complexes containing the bi-substrates **28** and **29** containing 2′F-ANA and DNA nucleic acids, respectively. This shift could be explained by the loss of the interaction between

this loop and the C⁷⁵ and A⁷⁶ nucleotides, which are not correctly positioned to interact with the protein.

The UDP-MurNAc-pentapeptides and the triazole rings in the four complexes were well defined and positioned as in the peptidyl-RNA complex, except for the peptidyl-2′F-RNA **26**, for which the D-iGlu² is repositioned (Supplementary Figure S3).

In all four structures, the N₃ of the triazole ring is in the vicinity of the catalytic residue Lys³⁰⁵, which has been shown to directly participate in the chemical step of the transfer reaction (**32**).

In the peptidyl-RNA complex, only the electron density of the C⁷⁴C⁷⁵A⁷⁶ extremity of the oligonucleotides was well defined (Figure 7A). We were able to observe an additional nucleotide (A⁷³) for the HNA, 2′F-ANA and DNA conjugate complexes (Figure 7B–E). Even more interestingly, for the 2′F-RNA:FemX complex, the electron density was sufficiently well defined for positioning all nucleotides (Figure 7C), making it possible to observe for the first time a full peptidyl-helix in complex with a Fem transferase enzyme.

These four complexes allow us to compare the structural features of the different tXNA analogs in interaction with a protein.

For the peptidyl-2′F-RNA (**26**) and peptidyl-HNA (**27**), the nucleotides show productive π -stacking interactions between both A⁷³ and C⁷⁴ bases and between C⁷⁴ and C⁷⁵ bases (Supplementary Figure S4A). For the 2′F-RNA complex, we also observe the Watson-Crick base pairing of G¹-C⁷² as well as G²-C⁷¹ (Supplementary Figure S4A). We further observed enzyme residues in the vicinity of the C⁷¹ and C⁷² bases that we had previously identified as major determinants of FemX specificity towards tRNA^{Ala} (Supplementary Figure S4B) (**35**). For the peptidyl-DNA (**29**) and peptidyl-2′F-ANA (**28**), C⁷⁵ is not well positioned to be in a π -stacking interaction with C⁷⁴.

We also noted that the positioning of nucleotide A⁷⁶ is different, depending on whether the bi-substrate is an RNA or DNA analogue (Figure 8). The A⁷⁶ adenine is rotated by 159° with 2′F-ANA (**28**) and DNA (**29**) and thus prevents this base from interacting with Ile²⁰⁸ and Leu³⁰¹ (Figure 8C and D), as observed for the RNA (PDB 4II9), 2′F-RNA (**26**), and HNA (**27**) complexes (Figure 8A to B). We previously showed that hydrophobic interactions between the A⁷⁶ terminal adenine and Ile²⁰⁸ side chain are needed for efficient activity of the Fem enzyme, as substitution of Ile²⁰⁸ by an alanine residue led to a 50-fold decrease in turnover number (**32**). The mispositioning observed for the A⁷⁶ adenine, which carries the L-alanine in the aminoacyl tRNA^{Ala}, might explain why compounds containing 2′F-ANA (**10b**) and DNA (**11b**) are not substrates of FemX (Figure 4) and why the corresponding compounds **20**, **21**, **28** and **29** are not inhibitors of the enzyme (Figures 5 and 6).

Concerning the 1′,5′-anhydrohexitol moiety in compound **27**, the 1.77 Å resolution of the structure allowed us to define, for the first time, the conformation of the HNA sugar and bases in a catalytic site (Supplementary Figure S5). A single structure of a complex between HNA containing oligonucleotide and an archaeal polymerase enzyme has been described but the conformation of the base and the sugar moieties could not be modeled because of insufficient

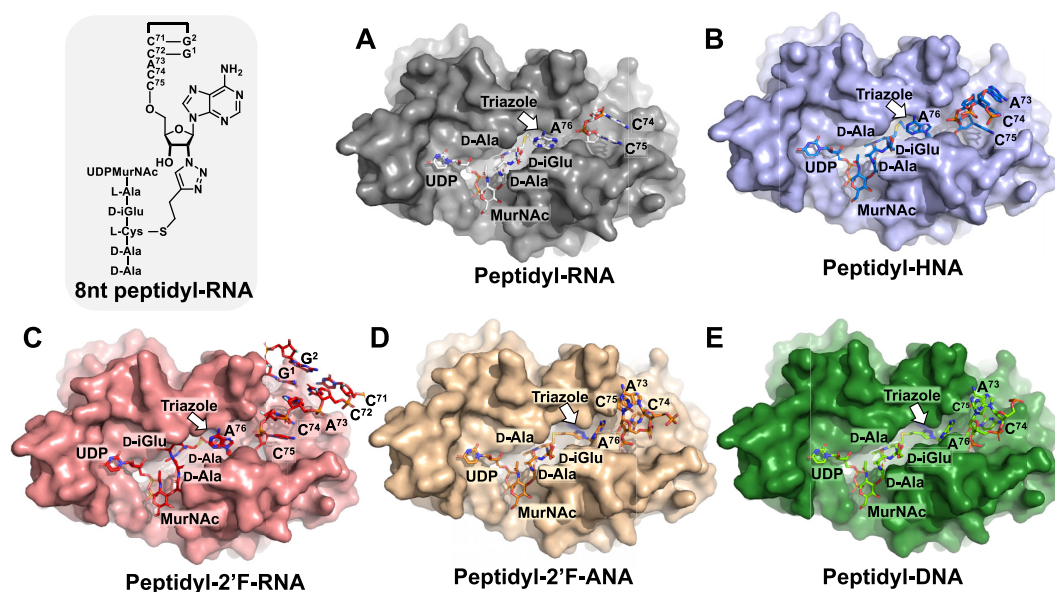


Figure 7. Structures of peptidyl-RNA and peptidyl-XNA bi-substrate analogs in complex with FemX. Protein in complex with bi-substrate containing RNA (A), HNA (B, compound 27), 2'F-RNA (C, compound 26), 2'F-ANA (D, compound 28) and DNA (E, compound 29).

resolution (12). In our case, the HNA sugar moiety could be perfectly superposed with the ribose of the RNA, confirming that the 1',5'-anhydrohexitol of HNA mimics the ribose in its C3'-endo conformation (Figure 8B).

We also explored the interactions of the penultimate C⁷⁵ sugar unit with the Phe³⁰⁴ residue conserved in all Fem transferases. This residue was shown to be important for activity, as its substitution by Ala or Leu decreased the FemX turnover number by 16- and 29-fold, respectively (32,39). The distance between 2'F and the phenyl group of Phe³⁰⁴ is 3.2 Å in the peptidyl-2'F-RNA compound 26 (Figure 8A), which corresponds to the sum of the Van der Waals radii of the two atoms (3.17Å). The fluorine in compound 26 is at a distance from Phe³⁰⁴ that can lead to a lone-pair π stacking interaction (lp- π) (40,41), which was calculated to result in a -1.5 kcal mol⁻¹ energy gain (42). This value is compatible with the free energy difference of binding of the RNA and 2'F-RNA compounds, as calculated from their inhibition constants: $K_i^{\text{RNA}} = 0.93$ μM ($\Delta G^\circ = -8.37$ kcal mol⁻¹) and $K_i^{2'F\text{-RNA}} = 0.056$ μM ($\Delta G^\circ = -10.05$ kcal mol⁻¹); $\Delta\Delta G^\circ = -1.68$ kcal mol⁻¹. For the HNA and DNA molecules, the distances between the C2' position of the C⁷⁵ sugar and the Phe³⁰⁴ are 4.7 and 3.6 Å, respectively (Figure 8B and D), and the absence of an electron-rich atom (O or F) on the sugar excludes an lp- π interaction. For compound 28 (2'F-ANA), the distance between the 2'F and Phe³⁰⁴ is 4.1 Å (Figure 8C), resulting in a less productive lp- π interaction between the fluorine and phenyl side chain of Phe³⁰⁴. These observations could explain the loss of inhibitory potency of bi-substrates 27, 28 and 29, which possess HNA, 2'F-ANA, and DNA at position C⁷⁵ relative to the peptidyl-RNA and the stronger inhibition for compound 26, which could be due to a stabilizing lp- π interaction between the fluorine pointing towards Phe³⁰⁴.

CONCLUSION

In this study, we designed the first tXNA molecules as substrates or inhibitors of an amino acyl tRNA-dependent enzyme. We show that tXNA can be synthesized using enzymatic ligation with T4 RNA ligase or by solid-phase synthesis. We were able to obtain Ala-tXNA^{Ala} and peptidyl-XNA analogs of different sizes containing XNA in various positions.

We used these tXNA molecules to study the impact of XNA nucleotides on the activity and inhibition of a bacterial Fem transferase enzyme (FemX), as a model of a non-ribosomal peptide synthesis process. We show that the impact of introducing XNA into the tRNA substrate depends on the nature of the XNA, both at the levels of the double-strand and single stranded parts of the tRNA^{Ala}. HNA and 2'F-RNA motifs did not significantly modify substrate binding or catalysis, whereas the presence of DNA or 2'F-ANA nucleotides abolished both catalysis and substrate binding.

In terms of modifications in the 3'-ACCA portion of the tRNA, we observed that the 2'F-RNA modification had a more positive impact on recognition by FemX than that with HNA nucleotides. The observed differences rely on the fact that, peptidyl-RNA, -HNA and -2'F-RNA are well positioned in the active site and form more-or-less productive lp- π stacking interactions with the Phe³⁰⁴ residue of the protein. The 2'F-ribose of the C⁷⁵ moiety appears to form a very strong interaction with Phe³⁰⁴, resulting in a 16-fold lower inhibition constant than the inhibitor-containing ribonucleotides ($K_i = 0.056$ μM versus 0.93 μM). Our structural data also show for the first time that the geometry of HNA nucleotides is virtually indistinguishable from that of ribonucleotides and that the 1',5'-anhydrohexitol of HNA can mimic a ribose in its C3'-endo sugar pucker. In contrast, introduction of 2'F-ANA and DNA residues in the

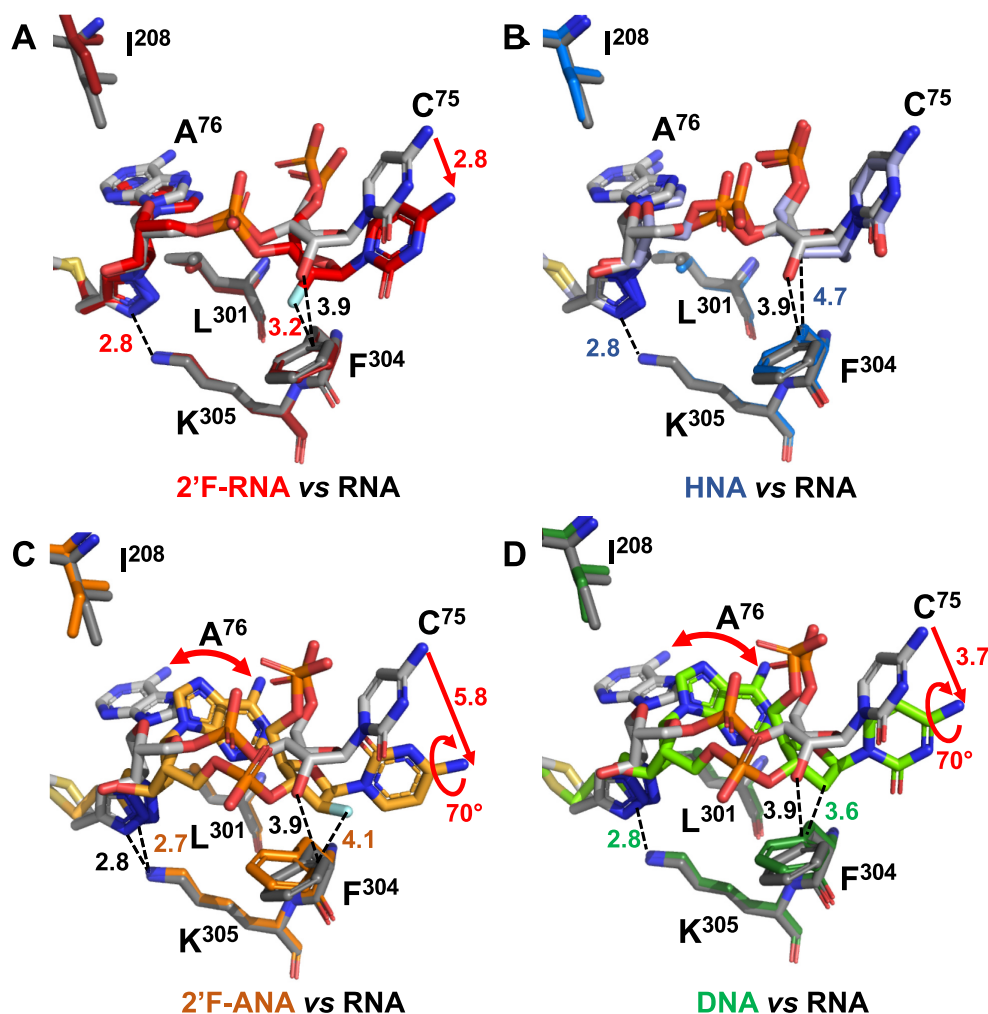


Figure 8. Superposition of the terminal nucleotides C^{75} and A^{76} of the peptidyl-RNA bi-substrate³² (gray) with the bi-substrates analogues **26** to **29** containing (A) 2'F-RNA (red), (B) HNA (blue), (C) 2'F-ANA (orange) and (D) DNA (green), respectively. Red arrows represent rotation or movement of the terminal C^{75} and A^{76} bases.

single strand induced a loss of one π -stacking interaction, leading to poor positioning of the ACCA terminal moiety.

In conclusion, we show here that tXNA molecules can be employed in a non-ribosomal peptidyl enzymatic process and this is the first example of the use of XNA in a functional *in vitro* assay involving protein catalysis. This result paves the way to test tXNA for RNA decoding, which could represent a major step forward in the development of an enzymatically stable translation system. In addition, the observation that tXNA can inhibit enzymes involved in bacterial cell-wall synthesis holds promise for the development of a new class of antibiotics and other tXNAs of therapeutic importance.

DATA AVAILABILITY

The atomic coordinates and structure factors for the reported crystal structures of FemX in complex with compounds **26**, **27**, **28** and **29** and the structural factors reported in this paper have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (accession nos. 7Z6A, 7Z5Y, 7Z6K and 7Z5Z, respectively).

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INBS-05. Mass spectrometry of unmodified oligonucleotides was made possible by the support of the Hercules Foundation of the Flemish Government (grant 20100225-7). X-ray diffraction data were collected at the SOLEIL Synchrotron (Saint-Aubin, France; PROXIMA-2A and PROXIMA-1 beamlines) and at the ESRF Synchrotron (Grenoble, France; ID23-2 beamline). We thank the beamline staff for their assistance and advice during data collection. This work has benefited from the expertise of the Crystallization Platform of I2BC (Gif-sur-Yvette, France).

FUNDING

French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) [ANR-10-INBS-05]; Hercules Foundation of the

Flemish Government [20100225-7]. Funding for open access charge: INSERM.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Herdewijn, P. and Marlière, P. (2009) Toward safe genetically modified organisms through the chemical diversification of nucleic acids. *Chem. Biodivers.*, **6**, 791–808.
- Hendrix, C., Rosemeyer, H., Verheggen, I., Van Aerschot, A., Seela, F. and Herdewijn, P. (1997) 1', 5' -Anhydrohexitol oligonucleotides: synthesis, base pairing and recognition by regular oligodeoxyribonucleotides and oligoribonucleotides. *Chem. Eur. J.*, **3**, 110–120.
- Vandermeeren, M., Préveral, S., Janssens, S., Geysen, J., Saison-Behmoaras, E., Van Aerschot, A. and Herdewijn, P. (2000) Biological activity of hexitol nucleic acids targeted at Ha-ras and intracellular adhesion molecule-1 mRNA. *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 655–663.
- Pezo, V., Liu, W., Abramov, M., Froeyen, M., Herdewijn, P. and Marlière, P. (2013) Binary genetic cassettes for selecting XNA-templated DNA synthesis in vivo. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **125**, 8297–8301.
- Pinheiro, V.B., Taylor, A.I., Cozens, C., Abramov, M., Renders, M., Zhang, S., Chaput, J.C., Wengel, J., Peak-Chew, S.-Y., McLaughlin, S.H. et al. (2012) Synthetic genetic polymers capable of heredity and evolution. *Science*, **336**, 341–344.
- Eremeeva, E., Fikatas, A., Margamuljana, L., Abramov, M., Schols, D., Groaz, E. and Herdewijn, P. (2019) Highly stable hexitol based XNA aptamers targeting the vascular endothelial growth factor. *Nucleic Acids Res.*, **47**, 4927–4939.
- Taylor, A.I., Pinheiro, V.B., Smola, M.J., Morgunov, A.S., Peak-Chew, S., Cozens, C., Weeks, K.M., Herdewijn, P. and Holliger, P. (2015) Catalysts from synthetic genetic polymers. *Nature*, **518**, 427–430.
- Verheggen, I., Van Aerschot, A., Toppet, S., Snoeck, R., Janssen, G., Balzarini, J., De Clercq, E. and Herdewijn, P. (1993) Synthesis and antihelical virus activity of 1,5-anhydrohexitol nucleosides. *J. Med. Chem.*, **36**, 2033–2040.
- Lescrinier, E., Esnouf, R., Schraml, J., Busson, R., Heus, H., Hilbers, C. and Herdewijn, P. (2000) Solution structure of a HNA–RNA hybrid. *Chem. Biol.*, **7**, 719–731.
- Maier, T., Przytylski, I., Strater, N., Herdewijn, P. and Saenger, W. (2005) Reinforced HNA backbone hydration in the crystal structure of a decameric HNA/RNA hybrid. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 2937–2943.
- Declercq, R., Aerschot, A.V., Read, R.J., Herdewijn, P. and Meervelt, L.V. (2002) Reinforced HNA backbone hydration in the crystal structure of a decameric HNA/RNA hybrid. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 928–933.
- Samson, C., Legrand, P., Tekpinar, M., Rozenski, J., Abramov, A., Holliger, P., Pinheiro, V., Herdewijn, P. and Delarue, M. (2020) Structural studies of HNA substrate specificity in mutants of an archaeal DNA polymerase obtained by directed evolution. *Biomolecules*, **10**, 1647.
- Guo, F., Li, Q. and Zhou, C. (2017) Synthesis and biological applications of fluoro-modified nucleic acids. *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 9552–9565.
- Erande, N., Gunjal, A.D., Fernandes, M. and Kumar, V.A. (2011) Probing the furanose conformation in the 2'–5' strand of isoDNA: RNA duplexes by freezing the nucleoside conformations. *Chem. Commun.*, **47**, 4007.
- Martínez-Montero, S., Deleavey, G.F., Kulkarni, A., Martín-Pintado, N., Lindovska, P., Thomson, M., González, C., Götte, M. and Damha, M.J. (2014) Rigid 2',4'-difluororibonucleosides: synthesis, conformational analysis, and incorporation into nascent RNA by HCV polymerase. *J. Org. Chem.*, **79**, 5627–5635.
- Damha, M.J., Wilds, C.J., Noronha, A., Brukner, I., Borkow, G., Arion, D. and Parniak, M.A. (1998) Hybrids of RNA and arabinonucleic acids (ANA and 2'-F-ANA) are substrates of ribonuclease H. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12976–12977.
- Wilds, C.J. and Damha, M.J. (2000) 2'-Deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleosides and oligonucleotides (2'-F-ANA): synthesis and physicochemical studies. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 3625–3635.
- Denisov, A.Y., Noronha, A.M., Wilds, C.J., Trempe, J.-F., Pon, R.T., Gehring, K. and Damha, M.J. (2001) Solution structure of an arabinonucleic acid (ANA)/RNA duplex in a chimeric hairpin: comparison with 2'-fluoro-ANA/RNA and DNA/RNA hybrids. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4284–4293.
- Iannazzo, L., Laisné, G., Fonvielle, M., Braud, E., Herbeuval, J.-P., Arthur, M. and Etheve-Quellejeu, M. (2015) Synthesis of 3'-Fluoro-tRNA analogues for exploring Non-ribosomal peptide synthesis in bacteria. *ChemBioChem*, **16**, 477–486.
- Patra, A., Paolillo, M., Charisse, K., Manoharan, M., Rozners, E. and Egli, M. (2012) 2'-Fluoro RNA shows increased Watson-Crick H-bonding strength and stacking relative to RNA: evidence from NMR and thermodynamic data. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 11863–11866.
- Pallan, P.S., Greene, E.M., Jicman, P.A., Pandey, R.K., Manoharan, M., Rozners, E. and Egli, M. (2011) Unexpected origins of the enhanced pairing affinity of 2'-fluoro-modified RNA. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 3482–3495.
- Pallan, P.S., Prakash, T.P., De Leon, A.R. and Egli, M. (2016) Limits of RNA 2'-OH mimicry by fluorine: crystal structure of bacillus halodurans RNase H bound to a 2'-FRNA:DNA hybrid. *Biochemistry*, **55**, 5321–5325.
- Rietmeyer, L., Fix-Boulier, N., Le Fournis, C., Iannazzo, L., Kitoun, C., Patin, D., Mengin-Lecreulx, D., Etheve-Quellejeu, M., Arthur, M. and Fonvielle, M. (2021) Partition of tRNA^{Gly} isoacceptors between protein and cell-wall peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.*, **49**, 684–699.
- Leibowitz, M.J. and Soffer, R.L. (1969) A soluble enzyme from *Escherichia coli* which catalyzes the transfer of leucine and phenylalanine from tRNA to acceptor proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 7.
- Hebecker, S., Krausze, J., Hasenkampf, T., Schneider, J., Groenewold, M., Reichelt, J., Jahn, D., Heinz, D.W. and Moser, J. (2015) Structures of two bacterial resistance factors mediating tRNA-dependent aminoacylation of phosphatidylglycerol with lysine or alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 10691–10696.
- Gondry, M., Sauguet, L., Belin, P., Thai, R., Amouroux, R., Tellier, C., Tuphile, K., Jacquet, M., Braud, S., Courçon, M. et al. (2009) Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 414–420.
- Garg, R.P., Gonzalez, J.M. and Parry, R.J. (2006) Biochemical characterization of VlmL, a Seryl-tRNA synthetase encoded by the valanimycin biosynthetic gene cluster. *J. Biol. Chem.*, **281**, 26785–26791.
- Fonvielle, M., Chemama, M., Villet, R., Lecerf, M., Bouhss, A., Valery, J.-M., Etheve-Quellejeu, M. and Arthur, M. (2009) Aminoacyl-tRNA recognition by the femX_{Wv} transferase for bacterial cell wall synthesis. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 1589–1601.
- Lodder, M., Wang, B. and Hecht, S.M. (2005) The N-pentenoyl protecting group for aminoacyl-tRNAs. *Methods*, **36**, 245–251.
- Fonvielle, M., Mellal, D., Patin, D., Lecerf, M., Blanot, D., Bouhss, A., Santarem, M., Mengin-Lecreulx, D., Sollogoub, M., Arthur, M. et al. (2013) Efficient access to Peptidyl-RNA conjugates for picomolar inhibition of non-ribosomal femX_{Wv} aminoacyl transferase. *Chem. Eur. J.*, **19**, 1357–1363.
- Fonvielle, M., Bouhss, A., Hoareau, C., Patin, D., Mengin-Lecreulx, D., Iannazzo, L., Sakkas, N., El Sagheer, A., Brown, T., Etheve-Quellejeu, M. et al. (2018) Synthesis of lipid-carbohydrate-peptidyl-RNA conjugates to explore the limits imposed by the substrate specificity of cell wall enzymes on the acquisition of drug resistance. *Chem. Eur. J.*, **24**, 14911–14915.
- Fonvielle, M., Li de La Sierra-Gallay, I., El-Sagheer, A.H., Lecerf, M., Patin, D., Mellal, D., Mayer, C., Blanot, D., Gale, N., Brown, T. et al. (2013) The structure of femX(Wv) in complex with a peptidyl-RNA conjugate: mechanism of aminoacyl transfer from Ala-trna(Ala) to peptidoglycan precursors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **52**, 7278–7281.
- Vastmans, K., Pochet, S., Peys, A., Kerremans, L., Van Aerschot, A., Hendrix, C., Marlière, P. and Herdewijn, P. (2000) Enzymatic incorporation in DNA of 1,5-Anhydrohexitol nucleotides. *Biochemistry*, **39**, 12757–12765.

34. Medina, E., Yik, E.J., Herdewijn, P. and Chaput, J.C. (2021) Functional comparison of laboratory-evolved XNA polymerases for synthetic biology. *ACS Synth. Biol.*, **10**, 1429–1437.
35. Villet, R., Fonvielle, M., Busca, P., Chemama, M., Maillard, A.P., Hugonnet, J.-E., Dubost, L., Marie, A., Josseaume, N., Mesnage, S. *et al.* (2007) Idiosyncratic features in tRNAs participating in bacterial cell wall synthesis. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6870–6883.
36. Chemama, M., Fonvielle, M., Villet, R., Arthur, M., Valéry, J.-M. and Etheve-Quellejeu, M. (2007) Stable analogues of Aminoacyl-tRNA for inhibition of an essential step of bacterial cell-wall synthesis. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12642–12643.
37. Lodder, M., Golovine, S., Laikhter, A.L., Karginov, V.A. and Hecht, S.M. (1998) Misacylated transfer RNAs having a chemically removable protecting group. *J. Org. Chem.*, **63**, 794–803.
38. Maillard, A.P., Biarrotte-Sorin, S., Villet, R., Mesnage, S., Bouhss, A., Sougakoff, W., Mayer, C. and Arthur, M. (2005) Structure-Based site-directed mutagenesis of the UDP-MurNAc-Pentapeptide-Binding cavity of the FemX alanyl transferase from *Weissellavi ridescens*. *J. Bacteriol.*, **187**, 3833–3838.
39. Biarrotte-Sorin, S., Maillard, A.P., Delettré, J., Sougakoff, W., Arthur, M. and Mayer, C. (2004) Crystal structures of *weissellaviridescens* FemX and its complex with UDP-MurNAc-Pentapeptide: insights into FemABX family substrates recognition. *Structure*, **12**, 257–267.
40. Auffinger, P., Hays, F.A., Westhof, E. and Ho, P.S. (2004) Halogen bonds in biological molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 16789–16794.
41. Mooibroek, T.J., Gamez, P. and Reedijk, J. (2008) Lone pair- π interactions: a new supramolecular bond? *Cryst. Eng. Comm.*, **10**, 1501.
42. Chawla, M., Chermak, E., Zhang, Q., Bujnicki, J.M., Oliva, R. and Cavallo, L. (2017) Occurrence and stability of lone pair- π stacking interactions between ribose and nucleobases in functional RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 11019–11032.

Bi-substrats à XNA ciblant FmhB

Dans cet article, nous avons mis en évidence que l'introduction de modifications 2'F-ARN dans la partie acide nucléique d'un BS permet d'améliorer sa fixation dans le site catalytique de FemX. C'est notamment l'introduction d'un 2'F-ARN en position C⁷⁵ du bras accepteur de l'ARN qui permet la formation d'une nouvelle interaction de type « lone-pair Pi stacking » avec la F³⁰⁴ de FemX. Cette phénylalanine est conservée chez toutes les transférases Fem rendant possible le développement d'inhibiteurs de haute affinité ciblant et inhibant les transférases Fem de *S. aureus*. Les HNA sont également des XNA intéressants du fait de leur capacité à mimer l'ARN et former des duplex plus stables que les 2'F-ARN.

Tous ces résultats nous ont mené à conduire une expérience préliminaire sur l'inhibition de FmhB par un BS à HNA. Nous avons mis en évidence que l'enzyme possède respectivement des K_i de 7,5 ± 0,06 nM et 3,6 ± 0,2 μM pour des molécules comportant une partie acide nucléique ARN ou HNA (**Figure 70**). Nous pensons que cette perte d'affinité de l'enzyme est dû à la présence de HNA en position CCA 3' terminal. En effet, dans l'étude menée sur FemX, nous avons montré que leur introduction au niveau du CCA 3' terminal de la partie acide nucléique d'un BS a un impact négatif sur l'affinité de l'enzyme pour la molécule.

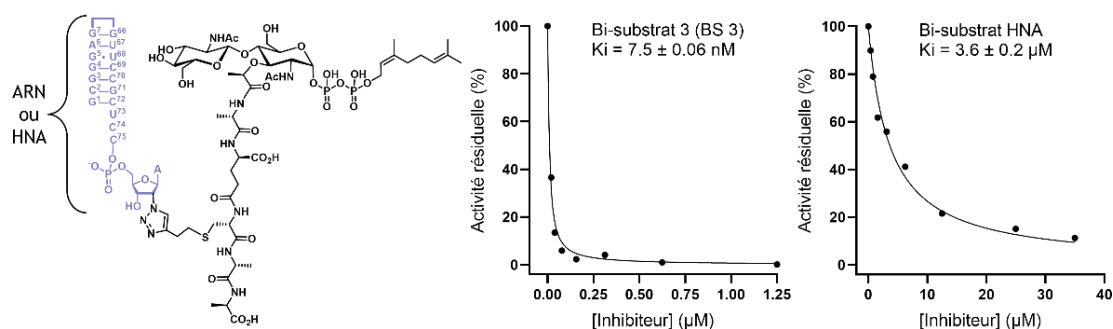


Figure 70 : Inhibition de FmhB par un BS composé de HNA.

De façon à mieux comprendre ce phénomène au niveau de l'extrémité 3' CCA de l'ARN, nous avons synthétisé des BS hybrides comprenant la totalité des résidus en série HNA, excepté à une position C⁷⁵ ou C⁷⁴ ou A⁷³, qui comporte un résidu 2'F-ARN. Cette étude (**Figure 71**) a permis de montrer que chaque résidu 2'F-ARN apportait un gain à l'affinité du BS et que le gain le plus important est observé pour la molécule qui comporte un résidu 2'F-ARN en position C⁷⁵, position impliquée dans l'interaction lone-pair Pi stacking.

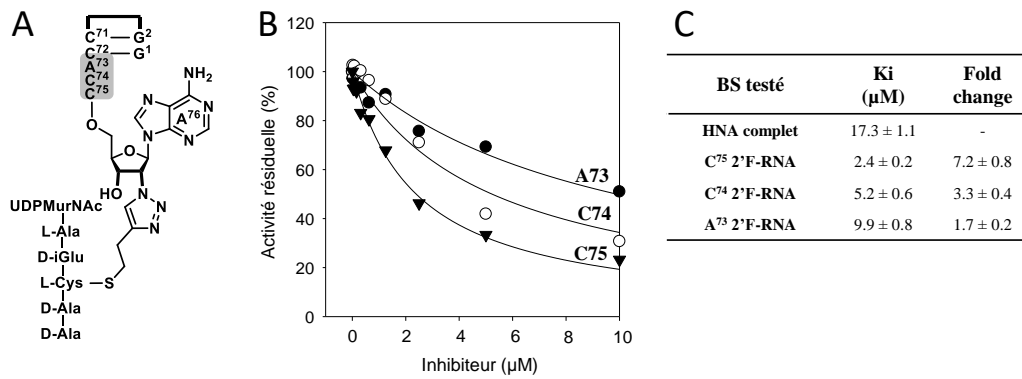


Figure 71 : Impact de l'introduction de 2'F-ARN dans un BS à base de HNA.

(A) Structure générale des BS hybrides HNA-2'F-ARN de 8 nt (en gris, les positions où un résidu 2'F-ARN a été introduit) **(B)** Courbes d'inhibition des composés contenant un seul nucléotide 2'F-ARN en position C⁷⁵, C⁷⁴ ou A⁷³ **(C)** Valeurs calculées de Ki.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Impact des modifications post-transcriptionnelles des Gly-ARNt^{Gly}

Durant la première partie de ma thèse nous nous sommes intéressés à la spécificité de substrats des transférases Fem pour les différents isoaccepteurs Gly-ARNt^{Gly}. Ces isoaccepteurs participent à la fois à la synthèse protéique et à la synthèse pariétale. Nous avons montré que la compétition pour le pool de Gly-ARNt^{Gly} est restreinte à la fois par la reconnaissance limitée des ARNt non protéogéniques par EF-Tu:GTP et par la reconnaissance limitée des ARNt protéogéniques par les transférases de la famille Fem. Nous avons pu montrer que les déterminants impliqués dans la discrimination des isoaccepteurs ARNt^{Gly} par les transférases Fem sont situés dans les tiges et boucles D et T des ARNt. Ces résultats nous ont menés à la construction d'un modèle de reconnaissance des Gly-ARNt^{Gly} par les transférases Fem, dans lequel le domaine coiled-coil des protéines interagit avec les boucles D et T de l'ARN. Ces boucles sont elles-mêmes en interaction pour permettre à l'ARN d'adopter sa conformation tridimensionnelle. Or, il a été montré que les modifications post-transcriptionnelles des ARNt contribuent au repliement, à la structure et à la fonction des ARNt de nombreuses façons. Les nucléotides modifiés peuvent par exemple, induire une stabilisation conformationnelle du corps de l'ARNt, créer et pré-structurer la tige-boucle de l'anticodon pour assurer un décodage efficace de l'ARNm dans le ribosome, ou encore agir comme déterminants pour la reconnaissance des ARNt par d'autres macromolécules (Väre et al., 2017). Une étude menée sur les ARNt de *S. aureus* a permis de montrer que le corps d'un ARNt^{Gly} protéogénique possède une modification mo5U en position 34 (Antoine et al., 2019). Chez *S. epidermidis* une autre étude a mis en évidence que deux isoaccepteurs ARNt^{Gly} supposés participer à la synthèse de la paroi (NP), ne possèdent pas de pseudouridine (Ψ) en position 55 mais deux modifications post-transcriptionnelles : de la 4-thiouridine (s4U) en position 8 et de la dihydrouridine (D) en position 19 (Roberts, 1974, 1972). La modification s4U a été étudiée chez les procaryotes et les archées et jouerait un rôle dans la protection contre les radiations UV (Shigi, 2014). La modification dihydrouridine serait quant à elle plutôt impliquée dans l'augmentation de la flexibilité des ARNt (Väre et al., 2017). Il serait donc intéressant de synthétiser des ARNt^{Gly} possédant ces modifications et d'évaluer l'impact de ces modifications sur la reconnaissance et l'activité des transférases Fem (**Figure 72**).

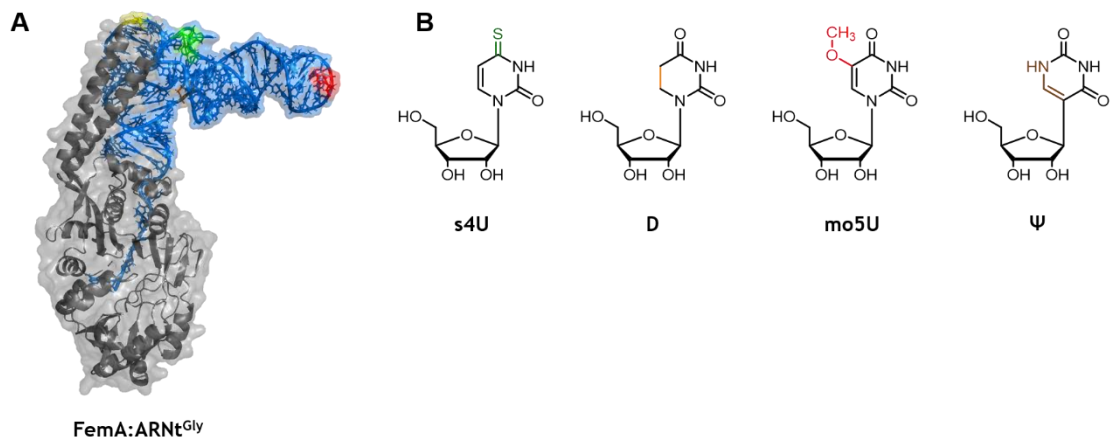


Figure 72 : Modifications post transcriptionnelles trouvées chez les ARNt^{Gly} de staphylocoques.

(A) Représentation 3D du complexe FemA:ARNt^{Gly}. Les positions des modifications post-transcriptionnelles trouvées chez les ARNt^{Gly} en position 8, 19 et 34 sont respectivement indiquées en vert, en orange et en rouge. La position 55 caractérisée par l'absence de la pseudouridine est colorée en marron. (B) Structures de la 4-thiouridine (s4U), de la dihydrouridine (D), de la 5-méthoxy-uridine (mo5U) respectivement trouvées en position 8, 19 et 34 et de la pseudouridine absente en position 55.

2. Mécanisme enzymatique des transférases Fem

L'obtention d'une structure en complexe avec une molécule bi-substrat mimant la présence de l'ARNt aminoacylé ainsi que du lipide dans le site catalytique de FmhB nous a permis de mettre en évidence un changement de conformation de l'enzyme entraînant un repositionnement du substrat lipidique. La comparaison de structures de FmhB sous forme d'apoenzyme ou en complexe avec le lipide II ou le BS n'a pas montré de changement au niveau de la conformation et la géométrie du site catalytique de l'enzyme. Cette observation est également applicable à FemX de *W. viridescens* (apoenzyme, ou complexée à l'UM5K ou au BS). Ces deux enzymes ont pour caractéristique de ne catalyser qu'une seule réaction enzymatique de transfert d'un ARNt aminoacylé vers le second substrat (UM5K ou lipide II) contrairement à FemA et FemB de *S. aureus*, qui font parties des seules Fem transférases connues pour catalyser deux réactions successives de transfert. De ce fait, dans le cas de FemA et FemB, il est possible que la fixation du Gly-ARNt^{Gly} et du substrat lipidique dans le site catalytique entraîne son remodelage pour permettre le transfert du premier ou du second résidu glycylo. L'obtention de structure de FemA et de FemB avec des molécules bi-substrats possédant une chaîne latérale mimant la présence de glycines pourrait jouer un rôle clé dans la compréhension du mécanisme enzymatique permettant le transfert de deux résidus glycylo. Cette étude resterait néanmoins très difficile à mettre en place notamment de par (i) l'impossibilité à cristalliser FemB à ce jour (ii) et la faible affinité de FemA et FemB pour des analogues de substrats lipidiques qui devrait être compensée par une partie acide nucléique plus longues compliquant donc l'obtention de cristaux.

Un niveau de complexité supplémentaire pour la compréhension du mécanisme enzymatique des transférases Fem se situe au niveau de la spécificité de substrat de ces enzymes pour des lipides possédant un résidu en position 2 amidé (D-iGln²) ou non amidé (D-iGlu²). En effet, nous avons montré que FmhB possède une plus faible activité avec un lipide amidé pouvant être expliquée par une perte d'affinité de l'enzyme pour ce substrat. De manière étonnante l'amidation du D-iGlu² d'un analogue stable de lipide II améliore la catalyse des deux réactions de FemA tout en ne modifiant pas l'affinité de l'enzyme pour ces lipides. Les réactions de FemB sont également accélérées en présence d'un substrat à D-iGln² mais son affinité pour les lipides amidés restent encore à déterminer. Une hypothèse pouvant expliquer ces résultats biochimiques pourrait être lié à la proximité des résidus D-iGlu² ou D-iGln² des lipides II et de la lysine catalytique de FemA ou de FemB qui joue un rôle crucial dans la stabilisation de l'intermédiaire oxyanion formé durant la catalyse. L'obtention de la structure de FmhB avec un BS nous a permis d'observer un mouvement du résidu D-iGlu² qui s'éloigne de la lysine catalytique en présence de BS (distance K³⁷⁴ / D-iGlu² passe de 9,7 Å à 11,4 Å) (**Figure 73**). Dans le cas où le repositionnement du substrat lipidique dans le site actif de FemA ou FemB entraînerait, non pas un éloignement mais un rapprochement du résidu D-iGlu², celui-ci pourrait alors perturber la stabilisation

de l'intermédiaire réactionnel en formant une paire ionique via son carboxylate avec l'amine primaire de la lysine catalytique. L'amidation du résidu D-iGlu abolirait alors la formation de cette paire ionique déstabilisatrice entraînant une meilleure activité de l'enzyme. Une autre hypothèse que l'on ne peut pas exclure serait une perturbation à longue distance faisant intervenir des molécules d'eau et/ou des résidus de la protéine.

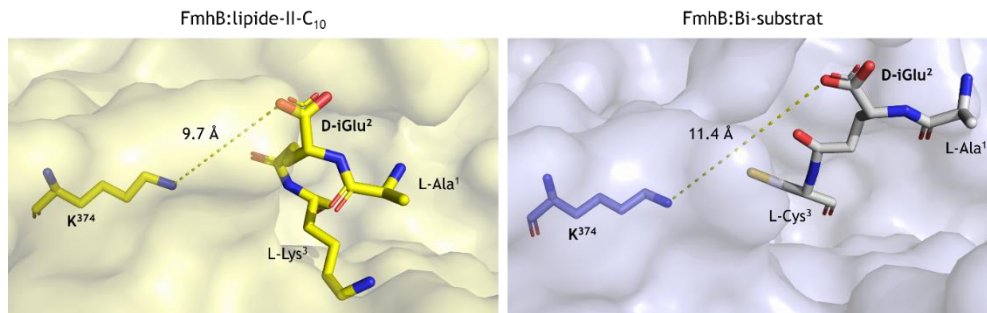


Figure 73 : Repositionnement du D-iGlu² en présence de BS mimant la présence d'un ARNt aminoacylé.

3. Modèle de régulation de la synthèse du peptidoglycane

L'étude des interactions et de la spécificité de substrats des transférases Fem au niveau lipidique nous a permis de proposer un modèle de synthèse et de maturation des différents intermédiaires lipidiques (**Figure 74**).

Nous pensons que la synthèse de la chaîne latérale débuterait par l'ajout de la première glycine par FmhB, menant à la formation du lipide-II-(Gly)₁. Cet intermédiaire non amidé étant mal utilisé par FemA, il devrait s'accumuler dans le cytoplasme ce qui devrait favoriser son amidation par le complexe MurT/GatD (voir **Figures 32 et 33** qui rendent compte de l'impact de l'amidation du résidu D-iGlu² sur l'accumulation de l'intermédiaire Lipide-II-C₁₀-(Gly)₁). Une fois le résidu D-iGlu² amidé, le lipide à (Gly)₁ serait ensuite pris en charge par FemA puis FemB pour mener à la synthèse de lipide-II-(Gly)₅ à D-iGln², produit final de la réaction. Etant donné l'amidation quasiment complète des résidus D-iGlu² dans le PG mature situé à la surface de *S. aureus*, nous pensons que l'amidation pourrait constituer un signal pour la translocation et l'export du lipide-II possédant une chaîne latérale pentaglycine à la surface de la bactérie, qui serait alors pris en charge par les PLP afin d'être intégré dans le PG déjà synthétisé (**Figure 74A**). Dans le cas où l'amidation n'aurait pas eu lieu après la réaction catalysée par FmhB, la synthèse de la chaîne pentaglycine serait tout de même possible avec une moindre efficacité et aboutirait à la synthèse du lipide-II-(Gly)₅ à D-iGlu² qui pourrait alors (i) inhiber FmhB pour ralentir sa catalyse et de (ii) permettre au complexe MurT/GatD de prendre en charge les intermédiaires non amidés (**Figure 74B**). En effet, il a été montré que MurT/GatD de *S. aureus* était capable d'amider, en présence d'une très forte concentration de complexe, des lipides II possédant des chaînes latérales à 0 ou 5 glycines (Münch et al., 2012). Il serait intéressant d'étudier de manière plus approfondie la spécificité de substrat du complexe MurT/GatD afin de déterminer si son activité est la même pour l'ensemble des intermédiaires lipidiques. L'étude de possibles interactions ou associations entre les transférases Fem et le complexe MurT/GatD semble également être une piste intéressante à explorer.

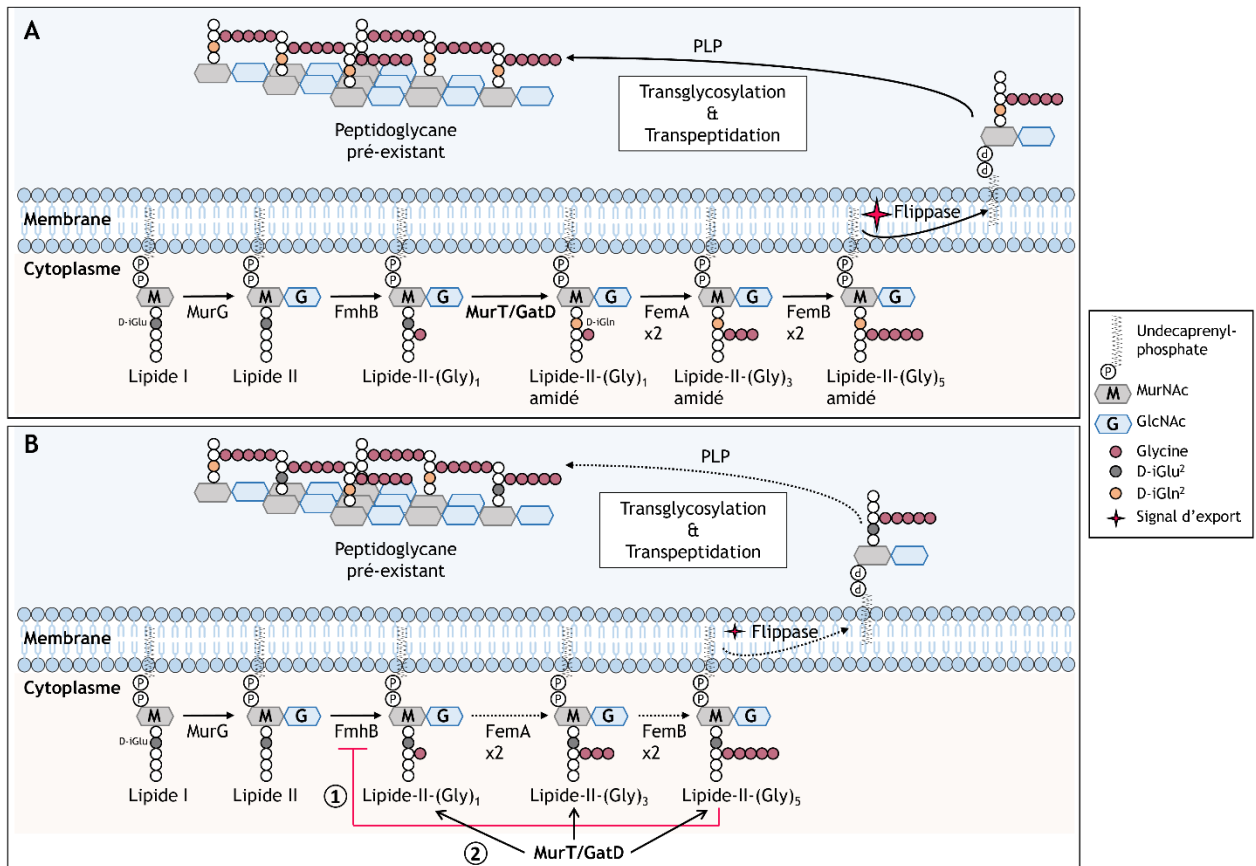


Figure 74 : Modèle proposé pour la synthèse et la maturation du lipide II chez *S. aureus*.

(A) L'amidation a lieu après l'action de FmhB et le lipide à chaîne latérale pentaglycine amidé est exporté à la surface de la bactérie. (B) En absence d'amidation, la synthèse du lipide à chaîne latérale pentaglycine est moins rapide et le produit final de réaction non amidé exerce (1) un rétrocontrôle négatif sur la catalyse de FmhB et (2) permet au complexe MurT/GatD d'amider les intermédiaires lipidiques avant qu'ils soient exportés à la surface.

Il a également été montré que les enzymes FemA et FemB peuvent former des homo- ou des hétéro-dimères (Rohrer and Berger-Bächi, 2003). Le rôle de la formation de ces dimères n'a pas été élucidé ce qui laisse place à plusieurs questions. Les enzymes FemA et FemB s'associent-elles de façon à améliorer leurs activités de manière réciproque (coopérativité) ? La formation de ces dimères est-elle une manière d'optimiser le système pour ne pas relâcher les différents intermédiaires lipidiques enchâssés dans la membrane après leur amidation ? Permet-elle l'échange de substrats d'une enzyme à l'autre ?

L'expérience préliminaire décrite dans le chapitre II partie 5 des résultats semble indiquer qu'il n'y a pas de coopérativité de FemA et FemB concernant les réactions catalysées par FemB avec des lipides non amidés. Le fait que le lipide II possédant 3 glycines soit le produit final des réactions catalysées par FemA mais également le premier substrat de FemB ne nous permet pas d'étudier l'impact de FemB sur l'activité de FemA avec les enzymes sauvages. Pour cela, il nous faudrait réaliser

un test cinétique couplé avec FemA, son substrat initial et un variant de FemB inactivé ne pouvant pas catalyser ses réactions (substitution de la lysine catalytique 381 par une alanine par exemple). Il serait également intéressant d'étudier la possible coopération des enzymes dans un contexte de lipides amidés. Un biais pourrait néanmoins être introduit dans ces expériences de par la présence d'étiquettes poly histidines qui pourraient jouer un rôle néfaste pour la formation de dimères FemA/FemB. Néanmoins, il est toutefois important de notifier que la formation d'homodimères FemA ou FemB est observée lors de la purification par chromatographie d'exclusion de taille des protéines.

Il reste encore beaucoup à faire pour explorer tous les aspects et les liens entre acteurs d'un système aussi complexe que la synthèse du PG. L'amidation semble jouer un rôle central dans ce processus de synthèse. Chez *S. aureus* il a été montré que des mutants incapables d'amider le résidu D-iGlu² de leurs lipides, présentent un phénotype caractérisé par un taux de réticulation du PG mature diminué, une réduction de la résistance aux β -lactamines et une réduction de la vitesse de croissance (Figueiredo et al., 2012; Gustafson et al., 1994; Münch et al., 2012). Ces études pourraient indiquer que l'amidation des résidus D-iGlu² peut avoir un impact sur l'activité des PLP. Il serait donc intéressant d'étudier la spécificité de substrat des PLP de *S. aureus* et plus particulièrement de la PLP2a, PLP de faible affinité acquise par les souches SARM et qui est essentielle à l'expression de la résistance aux β -lactamines.

Des études menées sur la bactérie *S. pneumoniae* ont montré que le complexe MurT/GatD est essentiel à la viabilité de cette bactérie et que l'amidation du résidu D-iGlu² est requise pour obtenir une transpeptidation *in vitro* efficace (Zapun et al., 2013). Chez *M. tuberculosis*, l'amidation semble également jouer un rôle important pour l'activité *in vitro* de la L,D-transpeptidase LDT_{Mt2} qui catalyse la formation de pont de type 3 → 3, présents majoritairement chez les mycobactéries à hauteur d'environ 70% (Ngadjewa et al., 2018). Bien que les L,D-transpeptidases ne soient pas structurellement apparentées aux PLP, et possèdent une cystéine plutôt qu'une sérine catalytique trouvée chez les PLP, ce phénomène semble également indiquer que l'amidation du résidu D-iGlu² a une grande importance d'une manière générale pour la formation des ponts interpeptidiques menant à la synthèse d'un PG mature et pleinement fonctionnel.

Cibler le processus d'amidation des bactéries pathogènes semble donc intéressant pour le développement de molécules antibactériennes, car un inhibiteur ciblant MurT/GatD aurait un impact sur l'activité des Fem et sur l'activité des PLP. Nous pourrions concevoir une stratégie de synthèse d'analogues de lipides II qui a déjà fait ses preuves dans le développement de composés capables d'inhiber l'activité transglycosylase de la PLP1b de *E. coli* (Dumbre et al., 2012).

4. Développement de molécules antibactériennes ciblant les transférases Fem

Dans le chapitre IV, nous avons mis en évidence que l'introduction de modifications 2'F-ARN en position C⁷⁵ du bras accepteur de l'ARN permet la formation d'une nouvelle interaction de type « lone-pair Pi stacking » avec la Phe³⁰⁴ de FemX. Cette phénylalanine est conservée chez toutes les transférases Fem rendant possible le développement d'inhibiteurs de haute affinité ciblant et inhibant les transférases Fem de *S. aureus*. Les HNA sont également des XNA intéressants du fait de leur capacité à mimer l'ARN et former des duplex plus stables que les 2'F-ARN. La suite de ce projet consistera à synthétiser des molécules BS possédant une partie acide nucléique hybride avec des 2'F-ARN au niveau du CCA terminal et des HNA pour améliorer à la fois la fixation au site catalytique de FmhB (2'F-ARN) et favoriser la formation de duplex stables (HNA).

Les inhibiteurs analogues de lipide II développés durant ma thèse n'ont malheureusement présenté aucune activité antibactérienne *in vitro* (lipide-II-C₁₀-glycol testé sur la souche *S. aureus* ATCC-29213 jusqu'à 1 500 µg.mL⁻¹), ce qui pourrait s'expliquer notamment par l'impossibilité de ces molécules à pénétrer dans le cytoplasme bactérien et donc à atteindre les transférases Fem. En ce qui concerne les inhibiteurs BS, seule une molécule a été testée sur la croissance de *W. viridescens* (Molécule **26** publication 2, jusqu'à 1 500 µg.mL⁻¹) sans qu'aucune activité antibactérienne ne soit détectée. Encore une fois, ce manque d'activité pourrait s'expliquer par l'impossibilité de cette molécule à atteindre sa cible dans le cytoplasme de la bactérie. Il serait donc intéressant de développer des stratégies de vectorisation pour permettre la pénétration de ces molécules dans le cytoplasme bactérien.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Antoine, L., 2021. Caractérisation des modifications post-transcriptionnelles des ARN non codants chez *Staphylococcus aureus* en réponse à divers stress environnementaux : analyse dynamique et fonctionnelle (Theses). Université de Strasbourg.
- Antoine, L., Wolff, P., Westhof, E., Romby, P., Marzi, S., 2019. Mapping post-transcriptional modifications in *Staphylococcus aureus* tRNAs by nanoLC/MSMS. *Biochimie* 164, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.003>
- Auger, G., van Heijenoort, J., Mengin-Lecreulx, D., Blanot, D., 2003. A MurG assay which utilises a synthetic analogue of lipid I. *FEMS Microbiology Letters* 219, 115–119. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(02\)01203-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(02)01203-X)
- Barreteau, H., Kovač, A., Boniface, A., Sova, M., Gobec, S., Blanot, D., 2008. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 168–207. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00104.x>
- Benson, T.E., Prince, D.B., Mutchler, V.T., Curry, K.A., Ho, A.M., Sarver, R.W., Hagadorn, J.C., Choi, G.H., Garlick, R.L., 2002. X-Ray Crystal Structure of *Staphylococcus aureus* FemA. *Structure* 10, 1107–1115. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00807-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00807-9)
- Berger-Bächi, B., 1983. Insertional inactivation of staphylococcal methicillin resistance by Tn551. *J Bacteriol* 154, 479–487. <https://doi.org/10.1128/jb.154.1.479-487.1983>
- Berger-Bächi, B., Barberis-Maino, L., Strässle, A., Kayser, F.H., 1989. FemA, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Molecular cloning and characterization. *Molec. Gen. Genet.* 219, 263–269. <https://doi.org/10.1007/BF00261186>
- Berger-Bächi, B., Strässle, A., Kayser, F.H., 1986. Characterization of an isogenic set of methicillin-resistant and susceptible mutants of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol* 5, 697–701. <https://doi.org/10.1007/BF02013308>
- Biarrotte-Sorin, S., Maillard, A.P., Delettré, J., Sougakoff, W., Arthur, M., Mayer, C., 2004. Crystal structures of *Weissella viridescens* FemX and its complex with UDP-MurNAc-pentapeptide: insights into FemABX family substrates recognition. *Structure* 12, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.01.006>
- Boniface, A., Bouhss, A., Mengin-Lecreulx, D., Blanot, D., 2006. The MurE synthetase from *Thermotoga maritima* is endowed with an unusual D-lysine adding activity. *J Biol Chem* 281, 15680–15686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506311200>
- Bouhss, A., Josseaume, N., Severin, A., Tabei, K., Hugonnet, J.-E., Shlaes, D., Mengin-Lecreulx, D., Van Heijenoort, J., Arthur, M., 2002. Synthesis of the L-alanyl-L-alanine cross-bridge of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan. *J Biol Chem* 277, 45935–45941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207449200>
- Bouhss, A., Mengin-Lecreulx, D., Blanot, D., van Heijenoort, J., Parquet, C., 1997. Invariant amino acids in the Mur peptide synthetases of bacterial peptidoglycan synthesis and their modification by site-directed mutagenesis in the UDP-MurNAc:L-alanine ligase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 36, 11556–11563. <https://doi.org/10.1021/bi970797f>
- Bouhss, A., Mengin-Lecreulx, D., Le Beller, D., Van Heijenoort, J., 1999. Topological analysis of the *MraY* protein catalysing the first membrane step of peptidoglycan synthesis. *Mol Microbiol* 34, 576–585. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01623.x>
- Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D.H., Mengin-Lecreulx, D., 2008. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 208–233. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00089.x>
- Boyd, N.K., Teng, C., Frei, C.R., 2021. Brief Overview of Approaches and Challenges in New Antibiotic Development: A Focus On Drug Repurposing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11.

- Bumsted, R.M., Dahl, J.L., Söll, D., Strominger, J.L., 1968. Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. X. Further study of the glycyl transfer ribonucleic acids active in peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 243, 779–782.
- Cardoso, P., Glossop, H., Meikle, T.G., Aburto-Medina, A., Conn, C.E., Sarojini, V., Valery, C., 2021. Molecular engineering of antimicrobial peptides: microbial targets, peptide motifs and translation opportunities. *Biophys Rev* 13, 35–69. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00784-y>
- Chemama, M., Fonvielle, M., Villet, R., Arthur, M., Valéry, J.-M., Etheve-Quelquejeu, M., 2007. Stable Analogues of Aminoacyl-tRNA for Inhibition of an Essential Step of Bacterial Cell-Wall Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 12642–12643. <https://doi.org/10.1021/ja0749946>
- Chérier, D., Patin, D., Blanot, D., Touzé, T., Barreateau, H., 2021. The Biology of Colicin M and Its Orthologs. *Antibiotics (Basel)* 10, 1109. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091109>
- Courvalin, P., 2006. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clinical Infectious Diseases* 42, S25–S34. <https://doi.org/10.1086/491711>
- Cressina, E., Lloyd, A.J., De Pascale, G., Roper, D.I., Dowson, C.G., Bugg, T.D.H., 2007. Adenosine phosphonate inhibitors of lipid II: Alanyl tRNA ligase MurM from *Streptococcus pneumoniae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17, 4654–4656. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.05.071>
- Cui, L., Murakami, H., Kuwahara-Arai, K., Hanaki, H., Hiramatsu, K., 2000. Contribution of a Thickened Cell Wall and Its Glutamine Nonamidated Component to the Vancomycin Resistance Expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2276–2285.
- da Costa, T.M., de Oliveira, C.R., Chambers, H.F., Chatterjee, S.S., 2018. PBP4: A New Perspective on *Staphylococcus aureus* β -Lactam Resistance. *Microorganisms* 6, E57. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030057>
- de Farias, S.T., Guimarães, R.C., 2008. Aminoacyl-tRNA synthetase classes and groups in prokaryotes. *Journal of Theoretical Biology* 250, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2007.09.025>
- Dumbre, S., Derouaux, A., Lescrinier, E., Piette, A., Joris, B., Terrak, M., Herdewijn, P., 2012. Synthesis of Modified Peptidoglycan Precursor Analogues for the Inhibition of Glycosyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 9343–9351. <https://doi.org/10.1021/ja302099u>
- Egan, A.J.F., Errington, J., Vollmer, W., 2020. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat Rev Microbiol* 18, 446–460. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0366-3>
- Ehlert, K., Schröder, W., Labischinski, H., 1997. Specificities of FemA and FemB for different glycine residues: FemB cannot substitute for FemA in staphylococcal peptidoglycan pentaglycine side chain formation. *J Bacteriol* 179, 7573–7576. <https://doi.org/10.1128/jb.179.23.7573-7576.1997>
- El Zoeiby, A., Sanschagrín, F., Levesque, R.C., 2003. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular Microbiology* 47, 1–12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03289.x>
- Figueiredo, T.A., Sobral, R.G., Ludovice, A.M., de Almeida, J.M.F., Bui, N.K., Vollmer, W., de Lencastre, H., Tomasz, A., 2012. Identification of Genetic Determinants and Enzymes Involved with the Amidation of Glutamic Acid Residues in the Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog* 8, e1002508. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002508>
- Filipe, S.R., Severina, E., Tomasz, A., 2001. Functional Analysis of *Streptococcus pneumoniae* MurM Reveals the Region Responsible for Its Specificity in the Synthesis of Branched Cell Wall Peptides*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 39618–39628. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106425200>
- Filipe, S.R., Severina, E., Tomasz, A., 2000. Distribution of the Mosaic Structured murM Genes among Natural Populations of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 182, 6798–6805.
- Filipe, S.R., Tomasz, A., 2000. Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4891–4896. <https://doi.org/10.1073/pnas.080067697>

- Fiser, A., Filipe, S.R., Tomasz, A., 2003. Cell wall branches, penicillin resistance and the secrets of the MurM protein. *Trends Microbiol* 11, 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.10.003>
- Fonvielle, M., Bouhss, A., Hoareau, C., Patin, D., Mengin-Lecreux, D., Iannazzo, L., Sakkas, N., Sagheer, A.E., Brown, T., Ethève-Quelquejeu, M., Arthur, M., 2018. Synthesis of lipid-carbohydrate-peptidyl-RNA conjugates to explore the limits imposed by the substrate specificity of cell wall enzymes on the acquisition of drug resistance. *Chemistry - A European Journal* 24, 14911–14915. <https://doi.org/10.1002/chem.201802360>
- Fonvielle, M., Chemama, M., Lecerf, M., Villet, R., Busca, P., Bouhss, A., Ethève-Quelquejeu, M., Arthur, M., 2010. Decoding the Logic of the tRNA Regiospecificity of Nonribosomal FemXWv Aminoacyl Transferase. *Angewandte Chemie International Edition* 49, 5115–5119. <https://doi.org/10.1002/anie.201001473>
- Fonvielle, M., Chemama, M., Villet, R., Lecerf, M., Bouhss, A., Valéry, J.-M., Ethève-Quelquejeu, M., Arthur, M., 2009. Aminoacyl-tRNA recognition by the FemXWv transferase for bacterial cell wall synthesis. *Nucleic Acids Res* 37, 1589–1601. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1039>
- Fonvielle, M., Li de La Sierra-Gallay, I., El-Sagheer, A.H., Lecerf, M., Patin, D., Mellal, D., Mayer, C., Blanot, D., Gale, N., Brown, T., van Tilbeurgh, H., Ethève-Quelquejeu, M., Arthur, M., 2013a. The Structure of FemXWv in Complex with a Peptidyl-RNA Conjugate: Mechanism of Aminoacyl Transfer from Ala-tRNA^{Ala} to Peptidoglycan Precursors. *Angewandte Chemie International Edition* 52, 7278–7281. <https://doi.org/10.1002/anie.201301411>
- Fonvielle, M., Mellal, D., Patin, D., Lecerf, M., Blanot, D., Bouhss, A., Santarem, M., Mengin-Lecreux, D., Sollogoub, M., Arthur, M., Ethève-Quelquejeu, M., 2013b. Efficient Access to Peptidyl-RNA Conjugates for Picomolar Inhibition of Non-ribosomal FemXWv Aminoacyl Transferase. *Chemistry – A European Journal* 19, 1357–1363. <https://doi.org/10.1002/chem.201201999>
- Francklyn, C., Schimmel, P., 1989. Aminoacylation of RNA minihelices with alanine. *Nature* 337, 478–481. <https://doi.org/10.1038/337478a0>
- Giannouli, S., Kyritsis, A., Malissovass, N., Becker, H.D., Stathopoulos, C., 2009. On the role of an unusual tRNA^{Gly} isoacceptor in *Staphylococcus aureus*. *Biochimie* 91, 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.10.009>
- Green, C.J., Vold, B.S., 1993. *Staphylococcus aureus* has clustered tRNA genes. *J Bacteriol* 175, 5091–5096. <https://doi.org/10.1128/jb.175.16.5091-5096.1993>
- Gustafson, J., Strässle, A., Hächler, H., Kayser, F.H., Berger-Bächi, B., 1994. The femC locus of *Staphylococcus aureus* required for methicillin resistance includes the glutamine synthetase operon. *J Bacteriol* 176, 1460–1467.
- Hanaki, H., Kuwahara-Arai, K., Boyle-Vavra, S., Daum, R.S., Labischinski, H., Hiramatsu, K., 1998. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *J Antimicrob Chemother* 42, 199–209. <https://doi.org/10.1093/jac/42.2.199>
- Hegde, S.S., Blanchard, J.S., 2003. Kinetic and Mechanistic Characterization of Recombinant *Lactobacillus viridescens* FemX (UDP-N-acetylmuramoyl Pentapeptide-lysine N6-Alanyltransferase) *. *Journal of Biological Chemistry* 278, 22861–22867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301565200>
- Hegde, S.S., Shrader, T.E., 2001. FemABX family members are novel nonribosomal peptidyltransferases and important pathogen-specific drug targets. *J Biol Chem* 276, 6998–7003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008591200>
- Heijenoort, J. van, 2001. Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat. Prod. Rep.* 18, 503–519. <https://doi.org/10.1039/A804532A>
- Henze, U., Sidow, T., Wecke, J., Labischinski, H., Berger-Bächi, B., 1993. Influence of femB on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 175, 1612–1620.
- Hong, H.-J., Hutchings, M.I., Hill, L.M., Buttner, M.J., 2005. The Role of the Novel Fem Protein VanK in Vancomycin Resistance in *Streptomyces coelicolor* *. *Journal of Biological Chemistry* 280, 13055–13061. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413801200>

- Hong, H.-J., Hutchings, M.I., Neu, J.M., Wright, G.D., Paget, M.S.B., Buttner, M.J., 2004. Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (vanK) required for drug resistance. *Mol Microbiol* 52, 1107–1121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04032.x>
- Hoops, S., Sahle, S., Gauges, R., Lee, C., Pahle, J., Simus, N., Singhal, M., Xu, L., Mendes, P., Kummer, U., 2006. COPASI--a COMplex PATHway SImulator. *Bioinformatics* 22, 3067–3074. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl485>
- Horcajo, P., de Pedro, M.A., Cava, F., 2012. Peptidoglycan Plasticity in Bacteria: Stress-Induced Peptidoglycan Editing by Noncanonical D-Amino Acids. *Microbial Drug Resistance* 18, 306–313. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0009>
- Huang, K.S., Weinger, J.S., Butler, E.B., Strobel, S.A., 2006. Regiospecificity of the peptidyl tRNA ester within the ribosomal P site. *J Am Chem Soc* 128, 3108–3109. <https://doi.org/10.1021/ja0554099>
- Huang, L.-Y., Huang, S.-H., Chang, Y.-C., Cheng, W.-C., Cheng, T.-J.R., Wong, C.-H., 2014. Enzymatic Synthesis of Lipid II and Analogues. *Angewandte Chemie* 126, 8198–8203. <https://doi.org/10.1002/ange.201402313>
- Hübscher, J., Jansen, A., Kotte, O., Schäfer, J., Majcherczyk, P.A., Harris, L.G., Bierbaum, G., Heinemann, M., Berger-Bächi, B., 2007. Living with an imperfect cell wall: compensation of femAB inactivation in *Staphylococcus aureus*. *BMC Genomics* 8, 307. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-307>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Jutras, B.L., Lochhead, R.B., Kloos, Z.A., Biboy, J., Strle, K., Booth, C.J., Govers, S.K., Gray, J., Schumann, P., Vollmer, W., Bockenstedt, L.K., Steere, A.C., Jacobs-Wagner, C., 2019. *Borrelia burgdorferi* peptidoglycan is a persistent antigen in patients with Lyme arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 13498–13507. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904170116>
- Kopp, U., Roos, M., Wecke, J., Labischinski, H., 1996. Staphylococcal peptidoglycan interpeptide bridge biosynthesis: a novel antistaphylococcal target? *Microb Drug Resist* 2, 29–41. <https://doi.org/10.1089/mdr.1996.2.29>
- Kouidmi, I., Levesque, R.C., Paradis-Bleau, C., 2014. The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Molecular Microbiology* 94, 242–253. <https://doi.org/10.1111/mmi.12758>
- Kraus, D., Kalbacher, H., Buschmann, J., Berger-Bächi, B., Götz, F., Peschel, A., 2007. Muropeptide modification-amidation of peptidoglycan D-glutamate does not affect the proinflammatory activity of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 75, 2084–2087. <https://doi.org/10.1128/IAI.01576-06>
- LaRiviere, F.J., Wolfson, A.D., Uhlenbeck, O.C., 2001. Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science* 294, 165–168. <https://doi.org/10.1126/science.1064242>
- Leisico, F., V. Vieira, D., Figueiredo, T.A., Silva, M., Cabrita, E.J., Sobral, R.G., Ludovice, A.M., Trincão, J., Romão, M.J., de Lencastre, H., Santos-Silva, T., 2018. First insights of peptidoglycan amidation in Gram-positive bacteria - the high-resolution crystal structure of *Staphylococcus aureus* glutamine amidotransferase GatD. *Sci Rep* 8, 5313. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22986-3>
- Lima, L.M., Silva, B.N.M. da, Barbosa, G., Barreiro, E.J., 2020. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry* 208, 112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>

- Ling, B., Berger-Bächi, B., 1998. Increased Overall Antibiotic Susceptibility in *Staphylococcus aureus* femAB Null Mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 936–938.
- Machnicka, M.A., Olchowik, A., Grosjean, H., Bujnicki, J.M., 2014. Distribution and frequencies of post-transcriptional modifications in tRNAs. *RNA Biology* 11, 1619–1629. <https://doi.org/10.4161/15476286.2014.992273>
- Maillard, A.P., Biarrotte-Sorin, S., Villet, R., Mesnage, S., Bouhss, A., Sougakoff, W., Mayer, C., Arthur, M., 2005. Structure-Based Site-Directed Mutagenesis of the UDP-MurNAc-Pentapeptide-Binding Cavity of the FemX Alanine Transferase from *Weissella viridescens*. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.187.11.3833-3838.2005>
- Mainardi, J.-L., Villet, R., Bugg, T.D., Mayer, C., Arthur, M., 2008. Evolution of peptidoglycan biosynthesis under the selective pressure of antibiotics in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 386–408. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00097.x>
- Malanovic, N., Lohner, K., 2016. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1858, 936–946. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.004>
- Matsushashi, M., Dietrich, C.P., Strominger, J.L., 1967. Biosynthesis of the Peptidoglycan of Bacterial Cell Walls: III. THE ROLE OF SOLUBLE RIBONUCLEIC ACID AND OF LIPID INTERMEDIATES IN GLYCINE INCORPORATION IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. *Journal of Biological Chemistry* 242, 3191–3206. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)95950-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)95950-8)
- Matsushashi, M., Dietrich, C.P., Strominger, J.L., 1965. Incorporation of Glycine into the Cell Wall Glycopeptide in *Staphylococcus aureus*: Role of sRNA and Lipid Intermediates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 54, 587–594.
- Meeske, A.J., Sham, L.-T., Kimsey, H., Koo, B.-M., Gross, C.A., Bernhardt, T.G., Rudner, D.Z., 2015. MurJ and a novel lipid II flippase are required for cell wall biogenesis in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 6437–6442. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504967112>
- Mengin-Lecreux, D., Falla, T., Blanot, D., van Heijenoort, J., Adams, D.J., Chopra, I., 1999. Expression of the *Staphylococcus aureus* UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanyl-d-Glutamate:L-Lysine Ligase in *Escherichia coli* and Effects on Peptidoglycan Biosynthesis and Cell Growth. *J Bacteriol* 181, 5909–5914.
- Monteiro, J.M., Covas, G., Rausch, D., Filipe, S.R., Schneider, T., Sahl, H.-G., Pinho, M.G., 2019. The pentaglycine bridges of *Staphylococcus aureus* peptidoglycan are essential for cell integrity. *Sci Rep* 9, 5010. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41461-1>
- Morlot, C., Straume, D., Peters, K., Hegnar, O.A., Simon, N., Villard, A.-M., Contreras-Martel, C., Leisico, F., Breukink, E., Gravier-Pelletier, C., Le Corre, L., Vollmer, W., Pietrancosta, N., Håvarstein, L.S., Zapun, A., 2018. Structure of the essential peptidoglycan amidotransferase MurT/GatD complex from *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Commun* 9, 3180. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05602-w>
- Moutiez, M., Belin, P., Gondry, M., 2017. Aminoacyl-tRNA-Utilizing Enzymes in Natural Product Biosynthesis. *Chem. Rev.* 117, 5578–5618. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00523>
- Münch, D., Roemer, T., Lee, S.H., Engeser, M., Sahl, H.G., Schneider, T., 2012. Identification and in vitro Analysis of the GatD/MurT Enzyme-Complex Catalyzing Lipid II Amidation in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathogens* 8, e1002509. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002509>
- Münch, D., Sahl, H.-G., 2015. Structural variations of the cell wall precursor lipid II in Gram-positive bacteria — Impact on binding and efficacy of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides* 1848, 3062–3071. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.04.014>
- Nameki, N., Tamura, K., Asahara, H., Hasegawa, T., 1997. Recognition of tRNA(Gly) by three widely diverged glycyl-tRNA synthetases. *J Mol Biol* 268, 640–647. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.0993>

- Navarre, W.W., Schneewind, O., 1999. Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 174–229.
- Ng, V., Chan, W.C., 2016. New Found Hope for Antibiotic Discovery: Lipid II Inhibitors. *Chemistry – A European Journal* 22, 12606–12616. <https://doi.org/10.1002/chem.201601315>
- Ngadjeua, F., Braud, E., Saidjalolov, S., Iannazzo, L., Schnappinger, D., Ehrt, S., Hugonnet, J.-E., Mengin-Lecreulx, D., Patin, D., Ethève-Quellejeu, M., Fonvielle, M., Arthur, M., 2018. Critical Impact of Peptidoglycan Precursor Amidation on the Activity of I,d-Transpeptidases from *Enterococcus faecium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Chemistry – A European Journal* 24, 5743–5747. <https://doi.org/10.1002/chem.201706082>
- Nöldeke, E.R., Muckenfuss, L.M., Niemann, V., Müller, A., Störk, E., Zocher, G., Schneider, T., Stehle, T., 2018. Structural basis of cell wall peptidoglycan amidation by the GatD/MurT complex of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 8, 12953. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31098-x>
- Nöldeke, E.R., Stehle, T., 2019. Unraveling the mechanism of peptidoglycan amidation by the bifunctional enzyme complex GatD/MurT: A comparative structural approach. *Int J Med Microbiol* 309, 151334. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151334>
- O'Neill, J., 2014. Antimicrobial resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Government of the United Kingdom.
- Patin, D., Boniface, A., Kovač, A., Hervé, M., Dementin, S., Barreteau, H., Mengin-Lecreulx, D., Blanot, D., 2010. Purification and biochemical characterization of Mur ligases from *Staphylococcus aureus*. *Biochimie, Special section "DNA and Chromosomes: Physical and Biological Approaches"* 92, 1793–1800. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.07.009>
- Peacock, J.R., Walvoord, R.R., Chang, A.Y., Kozlowski, M.C., Gamper, H., Hou, Y.-M., 2014. Amino acid-dependent stability of the acyl linkage in aminoacyl-tRNA. *RNA* 20, 758–764. <https://doi.org/10.1261/rna.044123.113>
- Périchon, B., Courvalin, P., 2009. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 4580–4587. <https://doi.org/10.1128/AAC.00346-09>
- Pinho, M.G., de Lencastre, H., Tomasz, A., 2001. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10886–10891. <https://doi.org/10.1073/pnas.191260798>
- Pinho, M.G., Kjos, M., Veening, J.-W., 2013. How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 11, 601–614. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3088>
- Plapp, R., Strominger, J.L., 1970. Biosynthesis of the Peptidoglycan of Bacterial Cell Walls: XVIII. PURIFICATION AND PROPERTIES OF I-ALANYL TRANSFER RIBONUCLEIC ACID-URIDINE DIPHOSPHATE-N-ACETYLMURAMYL-PENTAPEPTIDE TRANSFERASE FROM *LACTOBACILLUS VIRIDESCENS*. *Journal of Biological Chemistry* 245, 3675–3682. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)62979-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)62979-5)
- Qiao, Y., Srisuknimit, V., Rubino, F., Schaefer, K., Ruiz, N., Walker, S., Kahne, D., 2017. Lipid II overproduction allows direct assay of transpeptidase inhibition by β -lactams. *Nat Chem Biol* 13, 793–798. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2388>
- Radkov, A.D., Hsu, Y.-P., Booher, G., VanNieuwenhze, M.S., 2018. Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 87, 991–1014. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012921>
- Reith, J., Mayer, C., 2011. Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 92, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3486-x>
- Rietmeyer, L., Fix-Boulier, N., Le Fournis, C., Iannazzo, L., Kitoun, C., Patin, D., Mengin-Lecreulx, D., Ethève-Quellejeu, M., Arthur, M., Fonvielle, M., 2021. Partition of tRNAGly isoacceptors between protein and cell-wall peptidoglycan synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Research* 49, 684–699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1242>
- Roberts, R.J., 1974. Staphylococcal Transfer Ribonucleic Acids: II. SEQUENCE ANALYSIS OF ISOACCEPTING GLYCINE TRANSFER RIBONUCLEIC ACIDS IA AND IB FROM *STAPHYLOCOCCUS*

- EPIDERMIDIS TEXAS 26. *Journal of Biological Chemistry* 249, 4787–4796.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42389-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42389-2)
- Roberts, R.J., 1972. Structures of Two Glycyl-tRNAs from *Staphylococcus epidermidis*. *Nature New Biology* 237, 44–45. <https://doi.org/10.1038/newbio237044a0>
- Roberts, R.J., Gg, L., T, T., JI, S., 1974. Staphylococcal transfer ribonucleic acids. I. Isolation and purification of the isoaccepting glycine transfer ribonucleic acids from *Staphylococcus epidermidis* Texas 26. *The Journal of biological chemistry* 249.
- Rohrer, S., Berger-Bächli, B., 2003. Application of a bacterial two-hybrid system for the analysis of protein-protein interactions between FemABX family proteins. *Microbiology (Reading, Engl.)* 149, 2733–2738. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26315-0>
- Rohrer, S., Ehlert, K., Tschierske, M., Labischinski, H., Berger-Bächli, B., 1999. The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9351–9356.
<https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.9351>
- Ruane, K.M., Lloyd, A.J., Fülöp, V., Dowson, C.G., Barreteau, H., Boniface, A., Dementin, S., Blanot, D., Mengin-Lecreux, D., Gobec, S., Dessen, A., Roper, D.I., 2013. Specificity Determinants for Lysine Incorporation in *Staphylococcus aureus* Peptidoglycan as Revealed by the Structure of a MurE Enzyme Ternary Complex*. *Journal of Biological Chemistry* 288, 33439–33448.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.508135>
- Rubio Gomez, M.A., Ibba, M., 2020. Aminoacyl-tRNA synthetases. *RNA* 26, 910–936.
<https://doi.org/10.1261/rna.071720.119>
- Ruiz, N., 2015. Lipid Flippases for Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis. *Lipid Insights* 8s1, LPI.S31783.
<https://doi.org/10.4137/LPI.S31783>
- Sanderson, L.E., Uhlenbeck, O.C., 2007. The 51–63 base pair of tRNA confers specificity for binding by EF-Tu. *RNA* 13, 835–840. <https://doi.org/10.1261/rna.485307>
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., Charlier, P., 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 234–258.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
- Schleifer, K.H., Kandler, O., 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*. <https://doi.org/10.1128/br.36.4.407-477.1972>
- Schneider, T., Senn, M.M., Berger-Bächli, B., Tossi, A., Sahl, H.-G., Wiedemann, I., 2004. In vitro assembly of a complete, pentaglycine interpeptide bridge containing cell wall precursor (lipid II-Gly5) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 53, 675–685.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04149.x>
- Shepherd, J., Ibba, M., 2015. Bacterial transfer RNAs. *FEMS Microbiol Rev* 39, 280–300.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuv004>
- Shepherd, J., Ibba, M., 2013. Direction of aminoacylated transfer RNAs into antibiotic synthesis and peptidoglycan-mediated antibiotic resistance. *FEBS Lett* 587, 2895–2904.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.036>
- Shigi, N., 2014. Biosynthesis and functions of sulfur modifications in tRNA. *Frontiers in Genetics* 5.
- Strandén, A.M., Ehlert, K., Labischinski, H., Berger-Bächli, B., 1997. Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 179, 9–16. <https://doi.org/10.1128/jb.179.1.9-16.1997>
- Suzuki, T., 2021. The expanding world of tRNA modifications and their disease relevance. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 375–392. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00342-0>
- Taiji, M., Yokoyama, S., Miyazawa, T., 1983. Transacylation rates of (aminoacyl)adenosine moiety at the 3'-terminus of aminoacyl transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* 22, 3220–3225.
<https://doi.org/10.1021/bi00282a028>
- Tschierske, M., Mori, C., Rohrer, S., Ehlert, K., Shaw, K.J., Berger-Bächli, B., 1999. Identification of three additional *femAB*-like open reading frames in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 171, 97–102. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13417.x>

- Uhlenbeck, O.C., Schrader, J.M., 2018. Evolutionary tuning impacts the design of bacterial tRNAs for the incorporation of unnatural amino acids by ribosomes. *Current Opinion in Chemical Biology, Synthetic Biology / Synthetic Biomolecules* 46, 138–145. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.07.016>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Židek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., Figurnov, M., Cowie, A., Hobbs, N., Kohli, P., Kleywegt, G., Birney, E., Hassabis, D., Velankar, S., 2022. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research* 50, D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Väre, V.Y.P., Eruysal, E.R., Narendran, A., Sarachan, K.L., Agris, P.F., 2017. Chemical and Conformational Diversity of Modified Nucleosides Affects tRNA Structure and Function. *Biomolecules* 7, E29. <https://doi.org/10.3390/biom7010029>
- Villet, R., Fonvielle, M., Busca, P., Chemama, M., Maillard, A.P., Hugonnet, J.-E., Dubost, L., Marie, A., Josseaume, N., Mesnage, S., Mayer, C., Valéry, J.-M., Ethève-Quellejeu, M., Arthur, M., 2007. Idiosyncratic features in tRNAs participating in bacterial cell wall synthesis. *Nucleic Acids Res* 35, 6870–6883. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm778>
- Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M.A., 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews* 32, 149–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- WHO, 2021. Global tuberculosis report [WWW Document]. URL <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021> (accessed 7.7.22).
- WHO, 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed 6.1.22).
- Willing, S., Dyer, E., Schneewind, O., Missiakas, D., 2020. FmhA and FmhC of *Staphylococcus aureus* incorporate serine residues into peptidoglycan cross-bridges. *J Biol Chem* 295, 13664–13676. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014371>
- Wolf, A.J., Underhill, D.M., 2018. Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 18, 243–254. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.136>
- Xiong, Y., Steitz, T.A., 2004. Mechanism of transfer RNA maturation by CCA-adding enzyme without using an oligonucleotide template. *Nature* 430, 640–645. <https://doi.org/10.1038/nature02711>
- York, A., Lloyd, Adrian.J., del Genio, C.I., Shearer, J., Hinxman, Karen.J., Fritz, K., Fulop, V., Dowson, Christopher.G., Khalid, S., Roper, David.I., 2021. Structure-based modeling and dynamics of MurM, a *Streptococcus pneumoniae* penicillin resistance determinant present at the cytoplasmic membrane. *Structure* 29, 731-742.e6. <https://doi.org/10.1016/j.str.2021.03.001>
- Zapun, A., Philippe, J., Abrahams, K.A., Signor, L., Roper, D.I., Breukink, E., Vernet, T., 2013. In vitro reconstitution of peptidoglycan assembly from the Gram-positive pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *ACS Chem Biol* 8, 2688–2696. <https://doi.org/10.1021/cb400575t>

Résumé

La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces de santé publique à l'échelle mondiale et nécessite le développement urgent de nouveaux antibiotiques. La biosynthèse du peptidoglycane (PG), un composant majeur de la paroi bactérienne, est la cible des deux familles d'antibiotiques utilisées en thérapeutique humaine, les β -lactamines et les glycopeptides. Le PG est constitué de chaînes glycanes liées à des tiges peptidiques branchées entre elles par des ponts interpeptidiques. Chez de nombreuses bactéries à Gram positif, les chaînes latérales constituant ces ponts, sont synthétisées par les transférases de la famille Fem. Ces enzymes ont la particularité d'utiliser des ARNt aminoacylés comme substrats, qui sont des molécules également utilisées dans d'autres mécanismes biologiques importants, comme par exemple la synthèse des protéines via le ribosome. *S. aureus* possède trois transférases de la famille Fem (FmhB, FemA et FemB) qui catalysent le transfert séquentiel de cinq résidus glycyloxydes des Gly-ARNt^{Gly} vers les précurseurs cytoplasmiques du peptidoglycane (lipide II). Ces enzymes, qui sont essentielles à la viabilité de la bactérie et qui n'ont pas d'équivalent chez les cellules eucaryotes, constituent des cibles thérapeutiques de choix pour le développement de nouvelles molécules antibactériennes actives sur des souches résistantes aux antibiotiques.

De façon à comprendre le fonctionnement de ces enzymes, nous avons développé des méthodes de semi-synthèse d'ARNt aminoacylés, d'analogues de lipides II et de molécules bi-substrats. Ces outils, associés à des études structurales par rayons X et des tests enzymatiques *in vitro* nous ont permis de mieux comprendre les mécanismes catalytiques de ces enzymes, de comprendre le mode de reconnaissance des transférases Fem pour leurs substrats (ARNt et lipides) et enfin de synthétiser des inhibiteurs puissants de ces enzymes.

Mots clés : résistance aux antibiotiques ; transférases Fem ; ARNt ; lipide II

Abstract

Antibiotic resistance is one of the most pressing global health issues and urgently requires the development of new antibiotics. The biosynthesis of peptidoglycan (PG), a major component of the bacterial wall, is targeted by two families of antibiotics used in humans, the β -lactams and the glycopeptides. PG is composed of glycan strands bearing peptide stems which are crosslinked by interpeptide bridges. In many Gram-positive bacteria, interpeptide bridges are synthesized by Fem transferases whose substrates comprise aminoacylated tRNAs which are broadly implicated in cellular metabolism e.g. protein synthesis. *S. aureus* produces three Fem transferases (FmhB, FemA and FemB) which catalyze the sequential transfer of five glycyloxy residues from Gly-tRNA^{Gly} to cytoplasmic precursors of peptidoglycan (lipid II). These enzymes are essential and specific to bacteria which makes them prime targets for the development of new antibiotics active against resistant strains.

In order to explore the function of Fem transferases, we have developed methods for semi-synthesis of aminoacylated tRNAs, lipid II analogues and bi-substrate molecules. Using these molecular tools in X-ray crystallography and *in vitro* enzymatic assays, we were able to better understand the Fem catalytic mechanisms, to explore substrate recognition of Fem transferases (tRNAs and lipids) and finally, to synthesize a potent Fem inhibitor.

Keywords : Antimicrobial resistance ; Fem transferases ; tRNA ; lipid II