



HAL
open science

Cristallographie appliquée à la recherche d'inhibiteurs et étude de mécanismes réactionnels autour de la biosynthèse d'antibiotiques

Mathias Eymery

► **To cite this version:**

Mathias Eymery. Cristallographie appliquée à la recherche d'inhibiteurs et étude de mécanismes réactionnels autour de la biosynthèse d'antibiotiques. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-03145457

HAL Id: dumas-03145457

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03145457>

Submitted on 18 Feb 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UFR de
Pharmacie**

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

**UNIVERSITÉ
Grenoble
Alpes**

UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2018-2019

CRISTALLOGRAPHIE APPLIQUÉE A LA RECHERCHE D'INHIBITEURS ET ÉTUDE
DE MÉCANISMES RÉACTIONNELS AUTOUR DE LA BIOSYNTHÈSE
D'ANTIBIOTIQUES

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

Mathias Eymery

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le : 26/06/2019

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. Le Professeur Wim Burmeister (Tuteur universitaire)

Membres :

M. Le Docteur Yvain Nicolet (Directeur de thèse)

M. Le Professeur Emmanuel Drouet

Mme. Le Docteur Stéphanie Boval

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

**ENSEIGNANTS – ENSEIGNANTS/CHERCHEURS
HDR et ou Pharmaciens**

Statut	Nom	Prénom	Laboratoire	Pharmacien	HDR
MCF	ALDEBERT	DELPHINE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheREx	oui	oui
PU-PH	ALLENET	BENOIT	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheEMAS	oui	oui
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	oui	oui
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheEMAS	oui	non
MCF	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055	oui	non
PU-PH	BEDOUCHE	PIERRICK	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525, TheEMAS	oui	oui
MCF	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2, Inserm U1042	non	oui
MAST	BELLET	BEATRICE	-	oui	non
MCF	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM - UMR CNRS 5063	oui	non
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823	non	non
MCF	BRETON	JEAN	LCIB – UMR CEA E3	oui	oui
MCF	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042	non	non
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS	non	oui
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	Institute for Advanced Biosciences, UGA / Inserm U 1209 / CNRS 5309	oui	oui
Professeur Emerite	CALOP	JEAN	-	oui	oui
MCF	CAVAILLES	PIERRE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	non
MCU-PH	CHANOINE	SEBASTIEN	CR UGA - INSERM U1209 - CNRS 5309	oui	non
MCF	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
AHU	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
PU-PH	CORNET	MURIEL	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheREx	non	oui
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT		non	oui
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF Emérite	DELETRAZ-DELPORTE	MARTINE	LPSS – EAM 4129 LYON	oui	oui
MCF	DEMEILLIERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	oui
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI EA7408	oui	oui
PU	DROUET	EMMANUEL	IBS – UMR 5075 CEA CNRS HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	oui	oui
MCF	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042	non	oui

MCF	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2 – INSERM U1042	oui	oui
PRCE	FITE	ANDREE	-	non	non
MCU-PH	GARNAUD	CECILE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheReX	oui	non
PRAG	GAUCHARD	PIERRE- ALEXIS	-	non	non
MCU-PH	GERMI	RAPHAELE	IBS – UMR CEA CNRS 5075 HIV & virus persistants Institut de Biologie Structurale	oui	oui
MCF	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 – INSERM U1042	non	oui
MCF	GONINDARD	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553	non	non
Professeure Emérite	GRILLOT	RENEE	-	oui	oui
MCF Emérite	GROSSET	CATHERINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
MCF	GUIEU	VALERIE	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheReX	oui	non
MCF	HININGER- FAVIER	ISABELLE	LBFA – INSERM U1055	oui	oui
MCF	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	non
MCF	KOTZKI	SYLVAIN	HP2 – UMR S1042	oui	non
MCF	KRIVOBOK	SERGE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525 TheReX	non	oui
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR CNRS 5525	non	oui
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-	non	non
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
AHU	MINOVES	MELANIE	HP2 – INSERM U1042	oui	non
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	LBFA - INSERM U1055	non	oui
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	IAB – INSERM U1209	non	oui
MCF	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR CNRS 5553	non	oui
MCF	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
MCF	OUKACINE	FARID	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
MCF	PERES	BASILE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
MCF	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui
AHU	PLUCHART	HELENE	TIMC-IMAG – UMR CNRS 5525 ThEMAS	oui	non
MCF	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA	non	oui
MCF	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR CNRS 5063	non	oui
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042	oui	oui
PU-PH	SEVE	MICHEL	LBFA – INSERM U1055	oui	oui
MCF	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR CNRS 5063	oui	non
MCF	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
MCF	TARBOURIECH	NICOLAS	IBS – UMR CEA CNRS 5075	non	oui
MCF	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR CNRS 5063	non	non
PU	WOUESSIDJEW	DENIS	DPM – UMR CNRS 5063	oui	oui

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

CRI : Centre de Recherche INSERM
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institute for Advanced Biosciences
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LPSS : Laboratoire Parcours Santé Systémique
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
MCF : Maître de Conférences des Universités
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeur des Universités
PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
TMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR: Unité Mixte de Recherche
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

“C'est dans l'éternité que, dès à présent, il faut vivre. Et c'est dès à présent qu'il faut vivre dans l'éternité. Qu'importe la vie éternelle, sans la conscience à chaque instant de cette durée.” André Gide

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement Yvain Nicolet pour m'avoir permis de travailler sur un projet de cristallographie fondamental dans des conditions exceptionnelles, tout en ayant la possibilité de parfaire ma formation et d'apprendre des notions nouvelles. Je le remercie également pour les corrections effectuées et toute l'aide apportée dans l'interprétation des résultats.

Je remercie Wim Burmeister pour la correction de cette thèse d'exercice, qui m'aura permis d'être introduit aux concepts fondamentaux de la cristallographie. Je tiens également à le remercier pour la présidence de ma thèse d'exercice, qui marque une étape importante dans mes études.

Je suis également reconnaissant envers Emmanuel Drouet et Stéphanie Boval, qui ont accepté de faire partie de mon jury de thèse d'exercice afin d'évaluer ce travail.

Merci à Lydie Martin et Claire Saragaglia pour leur aide dans la préparation des échantillons nécessaire pour mener à bien ce projet ainsi qu'à Patricia Amara pour ses calculs théoriques et modélisations. Leur aide a été déterminante dans l'obtention des résultats.

Je remercie également Anne Volbeda et Mickaël Cherrier pour leur aide dans la manipulation des logiciels de cristallographie. De manière plus globale, je tiens à remercier toute l'équipe Métalloprotéine pour son aide et son accueil.

Concernant la faculté de Pharmacie, je tiens à remercier particulièrement Delphine Aldebert, Anne Briançon-Marjollet et Edwige Nicolle pour leur aide dans l'élaboration de mon cursus, via une formation par la recherche et leur soutien pour une poursuite

en thèse de science. D'une manière plus globale, je remercie tous les professeurs de l'UFR de Pharmacie ayant participé à ma formation de Pharmacien.

Je remercie également tous les laboratoires dans lesquels j'ai pu mener des recherches, notamment à l'Institute for Advanced Biosciences avec Eva Faurobert et Corinne Albigès-Rizo sur le projet CCM ainsi qu'à l'European Synchrotron Radiation Facility, avec Gianluca Santoni qui m'a introduit à la cristallographie il y a maintenant 2 ans.

Je tiens à remercier les pharmaciens et médecins du CHU Grenoble Alpes qui ont pu parfaire ma formation de professionnel de santé même si maintenant je me dirige plutôt vers les sciences, tout en maintenant un intérêt fort pour la recherche pharmaceutique et médicale.

La Fondation pour la Recherche Médicale joue également un rôle fondamental dans la réalisation de ce projet, en fournissant les moyens matériels nécessaires à sa réalisation dans de très bonne condition. Ainsi, je remercie chaleureusement la FRM et ses donateurs dans leur soutien à la recherche en santé et à l'innovation thérapeutique. Une pensée également pour l'Association Médecine Pharmacie Science et ses actions pour la recherche médicale et pharmaceutique.

Il est maintenant temps de remercier mes amis avec lesquels j'ai pu partager des moments agréables. En particulier, Charlène avec laquelle j'ai affronté les difficultés des études de pharmacie, pour notre soutien mutuel et tous les bons moments passés ensemble. Je me remémore également avec plaisir toutes les soirées que nous avons pu faire, avec mes autres compagnons d'armes Florent, Cassandre et Marie-France. Je remercie Mélissa et Nassim, mes collègues de double cursus Pharmacie-

Science, nous nous sommes rencontrés en deuxième année de Pharmacie suite à l'école de l'INSERM et notre amitié a pu se maintenir avec le temps, je trouve également formidable que notre motivation dans la recherche n'ait pas faibli et que nous soyons tous actuellement en train de nous orienter vers une poursuite en thèse de science, malgré les difficultés et les doutes.

Je remercie également le reste de la promotion et tous ceux que je n'ai pas pu citer, pour toutes les soirées pharma, les stages au CHU, les TP et CM qui ont bien rempli ma vie ces dernières années.

Une pensée également mes amis d'enfance, en particulier Jules et Grégoire. J'ai été très content de maintenir contact ces dernières années, malgré l'éloignement géographique, le temps qui passe et les choix de vie.

Pour finir, je remercie ma famille pour leur soutien dans mes études de Pharmacie et ma poursuite en thèse de science. En particulier mes parents qui m'ont toujours encouragé dans mes études même si cela n'était pas facile, mon frère Alexis qui a supporté ma PACES, mes études de pharmacie et finalement mon M2R : la vie n'étant pas un chemin tout tracé. Je suis maintenant plus avancé sur mon projet professionnel et cela n'aurait pas été possible sans leur soutien inconditionnel. Toutes les épreuves traversées par notre famille montrent qu'il ne faut jamais abandonner et toujours faire le maximum, cela a sûrement eu un impact fort dans mes choix et ma poursuite en recherche à l'interface entre la pharmacie et les sciences fondamentales.

Je remercie également le reste de ma famille pour leur soutien, en particulier mes grands-parents Simone, Mado et Guy ainsi que ma tante Maryse et mon oncle Olivier, qui m'ont toujours apporté une aide quand j'en avais besoin.

A tous ceux que je n'ai pas pu citer, je m'en excuse d'avance et je les remercie pour les moments agréables passés ensemble.

Table des matières

Remerciements	6
Table des figures:	12
Liste des abréviations :	14
Introduction :	15
Rappels historiques : apport de la cristallographie dans la recherche pharmaceutique et introduction du sujet de recherche.....	16
A] Apport de la cristallographie dans la recherche pharmaceutique.....	16
1.1 Rappels historiques et pratiques	16
1.2 Le screening <i>in crystallo</i> haut débit :	18
1.3 La découverte d'une tête de série « lead » médicamenteux à partir de structures tridimensionnelles :	23
B] Etat de l'art du sujet de recherche :	25
1.1. Le nosiheptide et sa voie de biosynthèse :	26
1.2 Le cas de nosL, une protéine à radical SAM.....	29
1.2.1 Les protéines à radical SAM :	29
1.2.2 La protéine NosL.....	31
Matériel et méthodes :	36
A] Principes généraux de la cristallographie.....	36
1.1 Cristallisation des protéines :	37
1.1.1 Diagramme de phase :	37
1.1.2 Méthode par diffusion de vapeur :	38
1.2 Diffraction des cristaux de protéines :	39
1.2.1 Symétrie des cristaux :	39
1.2.2 Principes physiques de la diffraction	40
1.3 Approche pratique de la cristallographie macromoléculaire :	44
1.3.1 Sources de rayons X.....	44
1.3.2 Sources synchrotrons :	45
1.3.3 Analyse des données de diffraction :	46
B] Matériel et méthode des expériences réalisées :	48

1.1 Production de NosL et de ses mutants :	48
1.1.1 Préparation du plasmide :	48
1.1.2 Culture et expression :	50
1.1.3 Purification :	51
1.1.4 Cocrystallisation de NosL :	52
1.1.5 Congélation des cristaux :	55
1.1.6 Analyse des données :	56
1.1.7 Docking moléculaire :	57
1.2. Caractérisations fonctionnelles :	58
1.2.1 Résonance paramagnétique électronique :	58
Résultats :	59
1. Amélioration de la solubilité du nosiheptide : co-cristallisation et mutagenèse de NosL	61
1.1.1 Accommodation du 5F et 6F tryptophane par NosL :	61
1.2.1 Modélisation de mutations et de fixation de substrats dans le site actif de NosL	64
1.3.1 Stratégie de modification du site actif : mutant P344G	67
2.1 Etude du mécanisme réactionnel de l'enzyme :	68
2.1.1 Rôle de la tyrosine 90 : mutant Y90F	68
2.2.1 Rôle de la cystéine 200 : mutant C200S	72
2.3.1 Suivi de la réaction enzymatique par RPE	73
Discussion	74
1.1 Changement d'activité :	74
1.1.1 Mutant P344G :	74
1.1.2 Biologie de synthèse :	75
1.2. Mécanisme de l'enzyme	75
1.2.1 Enzyme native :	75
1.2.2 Mutants pour comprendre le mécanisme catalytique :	76
1.2.3 Approche par alanine scanning :	76
Conclusion :	77
Bibliographie :	79
Annexes:	83

Table des figures:

Figure 1: Description des différentes étapes nécessaires à la résolution d'une structure macromoléculaire. Adapté de Blundell et al.....	20
Figure 2 : structure chimique du Nosiheptide (A) et séquence du peptide précurseur comprenant la partie leader et la partie centrale (B).....	27
Figure 3 : Schéma proposé par Lamattina et al pour la synthèse de la chaîne indolique du Nosiheptide (5).....	28
Figure 4 : réaction catalysée par les enzymes à radical SAM, conversion du SAM en L-Met et radical 5'dAdo (10).	30
Figure 5 : (A) Structure de nosL montrant le cluster Fe ₄ S ₄ et le site de liaison du L-Tryptophane. (B) vu détaillée du site actif et des interactions entre les ligands en noir et les acides aminés en jaune. PDB 4R34. (C) Réaction catalysée par NosL : conversion du L-tryptophane en Acide 3-méthyl-2-indolique.....	31
Figure 6 : mécanisme proposé par Zhang et al en 2011 pour la réaction catalysée par NosL.	33
Figure 7 : Mécanismes catalysés par NosL pour la synthèse du MIA. D'après Sicoli et al, 2016.....	34
Figure 8 : Intermédiaire réactionnel radicalaire détecté par RPE. Sicoli et al, 2016.	34
Figure 9 : Mécanisme proposé pour la conversion du L-tryptophane en MIA par NosL, en accord avec la production d'un cyanure (B). Bhandari et al, 2018.	35
Figure 10 : Diagramme de phase pour la cristallisation des protéines (A) et exemple de cristaux d'Acétylcholinestérase humaine (B). (A) Adapté des cours de cristallographie des Mines d'Albi	37
Figure 11: Technique de la goutte suspendue.....	39
Figure 12 : Représentation vectorielle de la loi de Bragg. Extraits des cours de cristallographie des mines d'Albi.	41
Figure 13 : représentation de la sphère d'Ewald. Extrait de X-Ray scattering. Ungar et al, 2014.....	43
Figure 14: L'European Radiation Facility, la station expérimentale de la ligne de lumière ID30A-3 et une vue détaillée de la ligne ID29.....	46
Figure 15 : Boite à gant pour l'expression des protéines recombinantes.....	51
Figure 16 : Boite à gant dédiée à la purification des protéines	52
Figure 17 : Boite à gant pour la cristallisation des protéines.....	53
Figure 18 : Matériel pour congeler des cristaux en boite à gant et cristal monté sur une boucle de cristallographie	56
Figure 19: Co-cristallisation du 6-fluoro- L-tryptophane et du 5-fluoro-L-tryptophane avec NosL. A : densité électronique $2Fo-Fc$ à 1 sigma calculée autour du 6-fluoro-L-tryptophane dans le site actif de NosL et zoom sur le résidu V366. B : interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif Y90, N175, R323 et P344. C : densité électronique densité électronique $2Fo-Fc$ à 1 sigma calculée autour du 5-fluoro-L-	

tryptophane avec le site actif de NosL et zoom sur le résidu V366. D interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif S340, R323, P344 et Y90.	63
Figure 20 : Accostage moléculaire du 5-nitro-tryptophane (en vert) dans l'enzyme mutante NosL P344G. Les résidus clés de l'enzyme native Y90, Q363 et R323 sont représentés en batons. Les résidus considérés pour une mutation F364 et V366 sont représentés en batons.....	64
Figure 21 : Accostage moléculaire du 5-nitro-tryptophane (en vert) dans l'enzyme mutante NosL P344G. Les résidus clés de l'enzyme native Y90, Q363 et R323 sont représentés en batons. Les résidus considérés pour une mutation F364 et V366 sont représentés en batons gras. Le résidu P344 muté en glycine est représenté en batons et boules en gras.	66
Figure 22 : Co-cristallisation du L-Tryptophane avec NosL P344G. A : densité électronique $2Fo-Fc$ à 1 sigma calculée autour L-tryptophane dans le site actif de NosL. B : interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif Y90, N175, R323 et P344.....	67
Figure 23 : Co-cristallisation de l'acide 2-carboxylique-1H-indole avec le mutant de NosL Y90F. A : densité électronique $2Fo-Fc$ à 1 sigma calculée autour l'acide 2-carboxylique-1H-2,3-dihydroindole dans le site actif de NosL. B : interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif Y90, N175, R323 et P344.....	70
Figure 24 : Co-cristallisation du L-tryptophane avec le mutant de nosL Y90F. A : densité électronique $2Fo-Fc$ à 1 sigma calculée autour L-tryptophane dans le site actif de NosL. B : interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif Y90, N175, R323 et P344.....	71
Figure 25 : Co-cristallisation du L-tryptophane avec le mutant de nosL C200S. A : densité électronique $2Fo-Fc$ à 1 sigma calculée autour L-tryptophane dans le site actif de NosL. B : interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif Y90, N175, R323 et P344.....	72
Figure 26 : suivi de la cinétique d'activation de NosL par résonance paramagnétique électronique à onde continue. Les échantillons correspondants au temps 0, 2s, 20s, 45s, 2min, 5 min et 10 min et permettent de vérifier la réduction du cluster Fer-Soufre.....	73

Table des tableaux :

Tableau 1 : Séquence des oligonucléotides des mutants de NosL	50
Tableau 2 : composés co-cristallisés avec NosL et ses mutants.....	55

Liste des abréviations :

IBS: Institut de Biologie Structurale

CEA: Commissariat à l'Énergie Atomique et aux énergies alternatives

ARN: Acide ribonucléique

ADN: Acide désoxyribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

SAM: S-Adenosyl-L-Methionine

5'-dAdo: 5'-deoxyadenosyl

DMIA: Acide 3,4-dimethyl-2-indolique

MIA: Acide 3-methyl-2-indolique

MI: 3-Méthylindole

RPE: Résonance Paramagnétique électronique

LC-MS : Chromatographie liquide – spectrométrie de masse

ESRF: European Synchrotron Radiation Facility

ILL : Institut Laue Langevin

CNRS : Centre Nationale de la Recherche Scientifique

UGA : Université Grenoble Alpes

Introduction :

Ce travail de thèse s'intéresse à l'apport de la cristallographie en Pharmacie et comporte une partie expérimentale correspondant à un exemple concret de recherche pharmaceutique.

La partie bibliographique donne un aperçu des techniques de cristallographie appliquées à la Pharmacie. Il y est notamment développé les principales étapes permettant de remonter à la structure d'une protéine par cristallographie rayon X, et l'apport de la biologie structurale dans la conception rationnelle de médicaments.

La partie expérimentale se concentre sur l'étude des mécanismes enzymatiques de NosL, une protéine à radical SAM responsable de la synthèse de la moitié indolique de l'antibiotique nosiheptide à partir du L-tryptophane. Le nosiheptide est un antibiotique possédant un spectre d'activité contre différentes bactéries à gram-positive multi-résistantes (*S. aureus*, *S. pneumoniae* et *C. difficile*), mais il n'est pas utilisé en clinique du fait de sa trop faible solubilité. Ainsi, nous nous attelons également à étudier la promiscuité de l'enzyme pour des variants hydrophiles du L-tryptophane et aux possibilités de mutagenèse de l'enzyme afin de rendre le nosiheptide plus soluble et efficace.

Rappels historiques : apport de la cristallographie dans la recherche pharmaceutique et introduction du sujet de recherche

A] Apport de la cristallographie dans la recherche pharmaceutique

1.1 Rappels historiques et pratiques

La cristallographie est la méthode de prédilection pour observer les structures des macromolécules (1). Depuis la découverte de la diffraction des cristaux par des rayons X par Max Von Laue en 1914 (2), de nombreux développements techniques ont permis de résoudre la structure de macromolécules d'intérêt biomédicales et pharmaceutiques. Le développement rapide des sources synchrotrons, à partir des années 1960, a permis fournir à la communauté de cristallographes des sources intenses de faisceaux de rayons X. D'autre part, les méthodes de cristallographie haut débit ont fait leur apparition dans les années 1990. Celles-ci permettent de trouver de manière semi-automatisée les conditions de cristallisations pour les protéines, afin de produire des cristaux de protéines qui pourront être irradiés à l'aide de faisceaux de rayons X produit par des synchrotrons ou des sources de laboratoires pour réaliser des expériences de diffraction. Les structures obtenues sont alors analysées afin d'une part de comprendre finement les mécanismes biologiques, comme les catalyses enzymatiques, et d'autre part arriver à prédire des interactions cibles-ligands (1,3,4).

Les origines de la biologie structurale sont étroitement liées à la découverte de la diffraction rayon X au début du XXème siècle (2). En 1953, Watson et Crick

découvrent la structure en double hélice de l'ADN ce qui correspond à la première avancée majeure dans le domaine de la biologie structurale. Il est également nécessaire de citer le travail de Dorothy Hodgkin, qui en 1964 a reçu le prix Nobel pour avoir déterminée par diffraction rayon X la structure de substances biochimiques majeures, dont notamment la pénicilline, la vitamine B12 et l'insuline (2). Il s'en suit en 1965 de la première structure d'enzyme résolue, celle du lysozyme par David C. Phillips (5). Cela représente la première description du mécanisme catalytique d'une enzyme par cristallographie aux rayons X et ouvre la voie pour des études approfondies sur des protéines d'intérêt biomédicales. Par la suite, la cristallographie des macromolécules prend rapidement son essor avec l'apparition des sources synchrotrons, beaucoup plus intenses que les anodes de laboratoire. Les premiers rayonnements synchrotrons sont émis en 1947 mais il faut attendre les années 70 pour débiter les projets de construction de synchrotrons dédiés, avec notamment l'ESRF à Grenoble qui émet ses premiers rayonnements synchrotrons en 1992 (6). Il s'en suit l'émergence d'un nouvel axe de recherche pour l'industrie pharmaceutique, la conception rationnelle de ligands à partir de structures tridimensionnelles de macromolécules. Les techniques développées par l'industrie pharmaceutique font largement appel au screening *in crystallo* haut débit, qui allie un cout réduit et une relative rapidité pour l'innovation thérapeutique (1,3,4).

La structure des protéines est dynamique et ne saurait se réduire à une conformation figée dans un cristal. En dépit de ces limitations, il est possible d'étudier des réactions enzymatiques complexes lors de cinétiques car la plupart des protéines gardent leurs propriétés catalytiques même sous forme cristalline. Cette méthode est donc idéale malgré ses limitations, car son pouvoir résolutif au niveau atomique

permet de fournir une description complète en présence ou en absence de ligands. Dans certains cas, notamment les protéines allostériques, la cristallographie aux rayons X a prouvé son efficacité pour retrouver les différentes étapes du processus. Toutefois, ces cas sont spécifiques : le changement de conformation des protéines allostériques a lieu en réponse à la fixation d'un ligand qui n'est pas modifié chimiquement par la protéine. La description de ces interactions peut être très intéressante pour améliorer un inhibiteur déjà connu. En cristallisant la protéine en complexe avec son inhibiteur, il est alors possible de comprendre finement les mécanismes mis en jeu et de développer des stratégies de modification de ligands pour améliorer la spécificité et l'affinité du composé (1).

La conception rationnelle de ligands à partir de la structure cristallographique de la cible est une méthode récente dans l'histoire de la Pharmacie. Ces techniques sont puissantes mais ne sont pas toujours satisfaisantes d'un point de vue scientifique et technique. En effet, de nombreux moyens sont consommés à l'occasion de screening de plusieurs milliers de composés, et les résultats ne sont reproductibles ou pertinents qu'à très grande échelle. Ainsi, le taux de succès est très faible et les coûts très importants. Les méthodes rationnelles de découverte de composés actifs ne se sont développées que bien plus tard, en parallèle des techniques de screening cellulaire haut débit.

1.2 Le screening *in crystallo* haut débit :

En 2002, Tom Blundell et al (3) ont réalisé un état de l'art de la recherche *in crystallo* haut débit et ont pu mettre en évidence les principaux facteurs liés à ce développement rapide et massif. Selon eux, en parallèle de l'apparition de sources

synchrotrons, c'est également les avancées rapides en biologie, chimie, informatique et robotique qui ont eu un impact majeur sur la découverte de médicaments par des méthodes basées sur la connaissance de la cible. Le séquençage haut débit a permis de fournir un nombre important de cibles potentielles, ce qui a posé les bases pour l'étude des structures protéiques. Les maladies et les potentielles cibles thérapeutiques peuvent ainsi être comprises au niveau moléculaire, ce qui est une avancée majeure par rapport aux études précédentes qui se contentaient de l'étude de phénotypes cellulaires et cliniques.

Il faut tout d'abord noter que le nombre de structures tridimensionnelles résolues a augmenté de manière très importante ces trois dernières décennies avec une augmentation exponentielle du nombre de structures, avec plus de 150 000 structures déposées dans le PDB (7), dont environ celles de 45 000 protéines différentes. Si nous prenons le processus nécessaire à la résolution d'une structure, nous voyons que beaucoup d'étapes doivent être automatisées pour permettre d'atteindre rapidement des objectifs de screening. Les différentes étapes de la résolution d'une structure sont résumées dans le schéma ci-dessous :

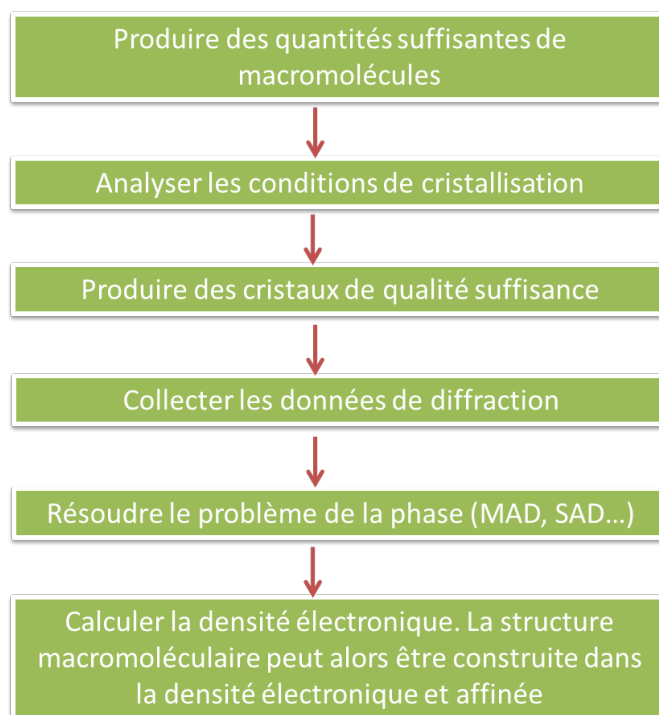


Figure 1: Description des différentes étapes nécessaires à la résolution d'une structure macromoléculaire. Adapté de Blundell et al.

L'expression, la purification et la cristallisation des protéines sont les étapes qui consomment le plus de temps. Les ressources nécessaires sont importantes et les chances de succès relativement faibles, car toutes les protéines ne peuvent être exprimées et caractérisées de manière satisfaisante. La première difficulté réside dans la détermination de domaines structuraux permettant d'exprimer la protéine, notamment une région capable de se replier et soluble (3). La protéine doit ensuite être purifiée, ce qui est complexe et nécessite l'utilisation de plusieurs procédés chromatographiques. Les impuretés peuvent empêcher une cristallisation correcte ou encore fausser les résultats : il faut s'assurer de purifier autant que possible avant d'envisager les étapes de cristallisation. L'automatisation de ces étapes d'expression et de purification sont possibles mais complexes : à l'heure actuelle il s'agit le plus

souvent d'expériences faiblement automatisées en recherche pharmaceutique comme académique.

Contrairement à la purification et à l'expression, la recherche des conditions de cristallisation peut facilement être automatisée. L'avancée des techniques en robotique permet maintenant un accès rapide et aisée à des plateformes de cristallisation qui vont tester des milliers de conditions pour une protéine donnée, avec des quantités de solutions de protéine de l'ordre du nanolitre (3). Cette approche est disponible pour les équipes académiques, les principales compagnies pharmaceutiques possèdent leurs propres plateformes de cristallisation ce qui leur permet des résultats rapides. Les conditions de cristallisations testées de manière automatique ont été développées de manière empirique par les cristallographes : rapidement il a été remarqué que des réactifs permettent souvent de cristalliser des protéines. C'est le cas notamment des polyéthylènes glycols, des sels et souvent en présence de tampons pour stabiliser le pH. La méthode de prédilection est la diffusion de vapeur, qui permet de faire des dépôts rapides de protéines et de tester de nombreuses conditions de cristallisation à l'échelle du nanolitre, ce qui réduit la quantité de protéine nécessaire pour faire un criblage. Le suivi vidéo est également essentiel pour surveiller l'apparition de cristaux ou de micro cristaux et permet de suivre l'évolution des conditions depuis un ordinateur, ce qui évite des manipulations humaines coûteuses en temps. Les plateformes de cristallisation possèdent en général une zone de préparation des plaques de cristallisation puis une zone de stockage robotisée, des photos sont prises à intervalles réguliers sur des périodes de quelques semaines à plusieurs mois. L'analyse des images par un cristallographe reste nécessaire car les logiciels ne sont pas encore capables de reconnaître un cristal

de manière satisfaisante dans une goutte suspendue. Généralement, les cristaux obtenus de manières automatisés ne sont pas de qualité suffisante pour une détermination structurale et les conditions prometteuses doivent être améliorées avec des essais manuels, en jouant sur la concentration des agents cristallisants et de la protéine voire sur le pH. Il n'est pas rare d'obtenir des agrégats de cristaux ou des microcristaux: il est alors nécessaire de retravailler les conditions de cristallisation pour obtenir des monocristaux de taille adéquate.

Une fois qu'un monocristal est obtenu, il est alors nécessaire de collecter les données de diffraction afin de résoudre sa structure. Différentes stratégies de collecte sont possibles selon le cristal et la protéine. Les stratégies associées à la détermination de structures *de novo* doivent être distinguées de celles pour lesquelles la structure a déjà été déterminée. En effet, la résolution de structure *de novo* est plus lourde et de nombreuses collectes sont souvent nécessaires avant d'obtenir les jeux de données nécessaires à la résolution de la structure (retrouver la phase). Le problème de la phase peut être résolu par des techniques utilisant la diffraction anormale ou par remplacement isomorphe afin de mesurer le facteur de structure et pouvoir calculer la densité électronique (voir le matériel et méthode). L'automatisation de la collecte des jeux de données est également possible et en développement dans les principaux synchrotrons. Notamment, l'European Synchrotron Radiation Facility (6) possède plusieurs lignes de lumières dédiées à la biologie structurale et développe massivement l'automatisation de la collecte. La ligne de lumière MASSIF-1 (longueur d'onde fixe à 12.8 keV) dédiée au remplacement moléculaire est entièrement automatisée et reçoit des cristaux d'utilisateurs académiques et industriels. Cela permet de collecter des milliers de cristaux par semaine pour un coût très faible, de

l'ordre de quelques euros par jeu de données et sans déplacement pour l'utilisateur. Les autres lignes de lumières du groupe de biologie structurale de l'ESRF permettent de réaliser des collectes utilisant la anomalie ou souvent combiné avec le remplacement isomorphe. Leur degré d'automatisation est également très élevé mais les collectes demandent la présence d'un cristallographe : les utilisateurs académiques et industriels peuvent se déplacer ou collecter à distance, grâce notamment au stockage des cristaux dans un robot directement sur la ligne de lumière, qui va être contrôlé par l'utilisateur sur place ou en accès distant (6).

1.3 La découverte d'une tête de série « lead » médicamenteux à partir de structures tridimensionnelles :

Même si la détermination des structures de novo des est très largement le domaine de la recherche académique, la détermination de la structure des macromolécules est une branche à part entière de la R&D pharmaceutique, toutes les principales industries de santé possèdent une unité de recherche en biophysique et biologie structurale, avec des plateformes dédiées à la cristallographie et à la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (3). Il existe également de nombreuses jeunes entreprises ou entreprises de tailles moyennes qui développent exclusivement des solutions thérapeutiques à partir de structures tridimensionnelles, comme c'est le cas pour NovAlix (8) présent au synchrotron Soleil notamment, ou encore Astex Pharmaceuticals fondée en 1999 par le Pr Tom Blundell, le Dr Chris Abell et le Dr Harren Jhoti à Cambridge en Angleterre (9). Astex Pharmaceuticals est spécialisée dans le développement de médicaments, en oncologie principalement. D'autres exemples peuvent être cités, dont notamment Proteros (10) à Munich en Allemagne, qui intègre biochimie, cristallographie, biophysique et chimie médicinale pour la

découverte de nouveaux principes actifs. Le niveau de compétences nécessaires pour ce type de recherche est très élevé : il faut à la fois être formé en cristallographie et également en chimie afin de dessiner des molécules chimiques pour une cible thérapeutique donnée. La concurrence est très importante pour obtenir des données structurales pour des cibles thérapeutiques et le design de lead actifs est compliqué du fait des nombreuses possibilités qu'offre un site actif. Les premières étapes de la conception de médicaments « drug design » *in silico* commencent par l'analyse du site actif et des principales interactions ligands cibles. La co-cristallisation de la protéine d'intérêt avec ses ligands endogènes ou de potentiels inhibiteurs est essentielle pour comprendre finement les acides aminés essentiels aux interactions. Des études de mutagenèse dirigée, s'attellant à modifier les acides aminés de l'interaction cible-ligand sont souvent nécessaires pour comprendre les mécanismes en jeu et le type d'interaction. L'analyse des sites d'intérêts débute alors par l'identification des liaisons hydrogènes possibles et le calcul des énergies de liaisons.

Il est alors possible de réaliser un « docking » (accostage moléculaire) de potentiels inhibiteurs, par des approches virtuelles *in silico* qui vont permettre d'identifier des interactions favorables ou défavorables à la liaison du ligand dans la zone d'intérêt. Ces approches sont très développées au sein de l'industrie pharmaceutique, mais ne peuvent remplacer l'expérimentation *in vitro*. Toutefois, les coûts nécessaires pour réaliser des prédictions d'affinité sont très largement inférieurs aux méthodes expérimentales classiques ce qui explique leur utilisation de masse. La difficulté réside dans l'évaluation d'une solution de l'arrimage « docking » par une fonction de classification (scoring), qui n'a pas de signification intrinsèque si ce n'est de classer les affinités théoriques entre plusieurs ligands potentiels. Malgré les

difficultés, ces approches ont permis de découvrir de nombreux médicaments. En particulier, les inhibiteurs de la protéase dans le HIV ont été développés par des méthodes dites basées sur la cible, après avoir cristallisé et résolu la structure de la protéase. Un autre exemple majeur est l'imatinib, un inhibiteur de la protéine de fusion BCR-ABL, à l'origine de leucémies myéloïdes chroniques. Ce médicament a changé la vie de nombreux patients en faisant passer la survie médiane d'environ 3 ans à une survie supérieure à 90% 8 ans après le diagnostic (11). D'autres exemples de développements thérapeutiques plus récents, viennent confirmer l'attrait de la cristallographie dans la découverte de nouvelles thérapeutiques. Ainsi, nous pouvons citer le dabigatran qui a été conçu à partir de la structure de la thrombine. En 1992, Brandstetter et al ont résolu la structure de la thrombine bovine en complexe avec un inhibiteur peptidique dérivant de la benzamidine (12). Cette découverte a marqué la première étape dans la découverte du dabigatran, qui sera finalement choisi comme tête de série pour le développement pharmaceutique. En 2007, Wienen et al publient une étude montrant l'efficacité in vitro et in vivo, et une bonne absorption sous une forme modifiée, le dabigatran etexilate (13,14). Ce médicament est maintenant largement utilisé en clinique en prévention des événements thromboemboliques, des AVC, des embolies et en traitement des thromboses veineuses pulmonaires ainsi que des embolies pulmonaires.

B] Etat de l'art du sujet de recherche :

Dans le cadre de cette thèse d'exercice, un exemple concret de l'apport de la cristallographie dans la recherche pharmaceutique est présenté. Il s'agit d'un travail

expérimental en cristallographie autour de la synthèse de la partie indolique de l'antibiotique nosiheptide par la métalloprotéine NosL.

1.1. Le nosiheptide et sa voie de biosynthèse :

Le nosiheptide (voir la figure 2) est un thiopeptide antibiotique produit par la bactérie *Streptomyces actuosus* (15). Il est hautement modifié, riche en soufre et possède plusieurs cycles thiazoles organisés autour d'une structure polymacrocyclique. Il fait partie des peptides synthétisés par le ribosome et modifiés lors d'étapes post-traductionnelles. Son utilisation dans les élevages en tant qu'additif alimentaire est courante, mais il n'est actuellement pas administré chez l'homme. La classe des thiopeptides n'est pas encore exploitée alors qu'elle pourrait être intéressante pour cibler certaines bactéries résistantes aux antibiotiques (16). De manière générale, il a été montré que les thiopeptides ont une activité importante sur les bactéries gram-positives et peu ou pas d'activités sur les gram-négatives (16). Ainsi, certains représentants de cette classe d'antibiotiques ont une action forte sur les staphylocoques résistants à la méthicilline, les pneumocoques résistants à la pénicilline et les entérocoques résistants à la vancomycine (15,16). Les mécanismes d'inhibition étant différents, le nosiheptide n'est pas affecté par ces mécanismes de résistance. La pharmacologie des thiopeptides n'est pas entièrement connue, mais il semble que le mécanisme principal est une inhibition de la fixation de l'aminoacyl-t-ARN au complexe ribosomique (17). L'introduction d'une nouvelle classe d'antibiotiques pourrait permettre de cibler les bactéries résistantes aux antibiotiques courants, très fréquentes en milieu hospitalier avec notamment les infections nosocomiales. Son utilisation n'est pas répandue pour le moment du fait des faibles investissements des entreprises pharmaceutiques pour développer des antibiotiques,

mais aussi de par la faible solubilité du nosiheptide. Il est ainsi nécessaire de trouver des analogues présentant une meilleure solubilité et une affinité plus élevée. La structure de l'antibiotique nosiheptide est détaillée dans la figure 2A ci-dessous.

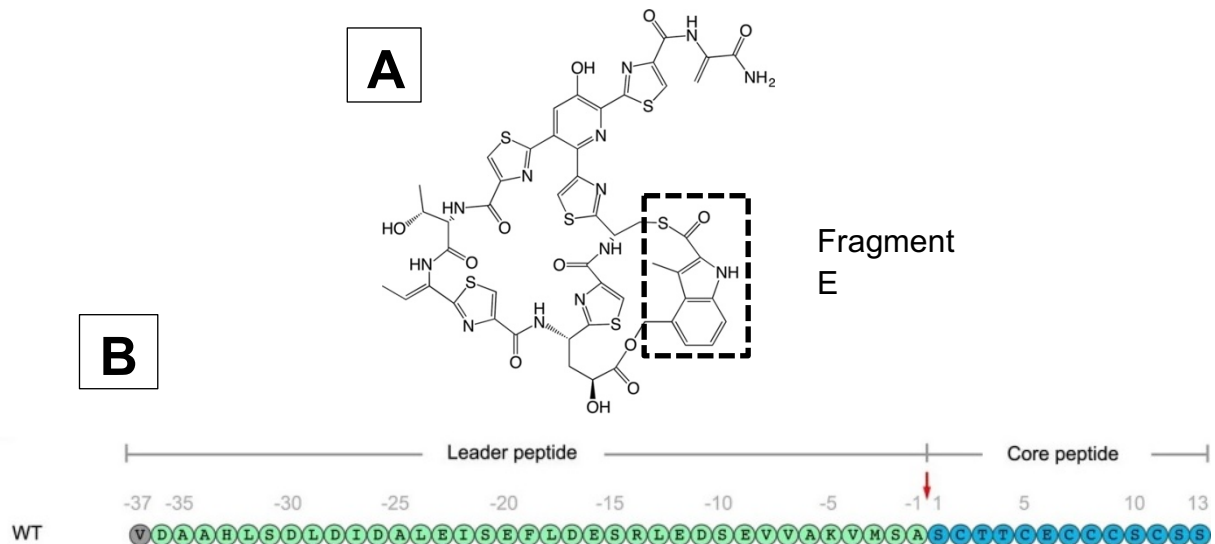


Figure 2 : structure chimique du Nosiheptide (A) et séquence du peptide précurseur comprenant la partie leader et la partie centrale (B).

Le nosiheptide est, par convention, divisé en fragments et en deux hémisphères sud et nord (15). Il est classé dans les thiopeptides de la série e. Il est organisé autour d'une structure macrocyclique qui contient cinq cycles thiazole, une sérine et des thréonines déshydratés (figure 1A). Le groupement central est une hydroxypyridine tétra substituée (19). Le fragment E est celui qui suscite le plus d'intérêt de par son mécanisme de formation. Il possède un pont dérivant de l'acide 3,4-dimethyl-2-indolique qui relie le groupement méthyl en position 4 à l'acide glutamique du peptide. L'acide carboxylique est, lui, connecté à la cystéine du peptide via une liaison thioester (15).

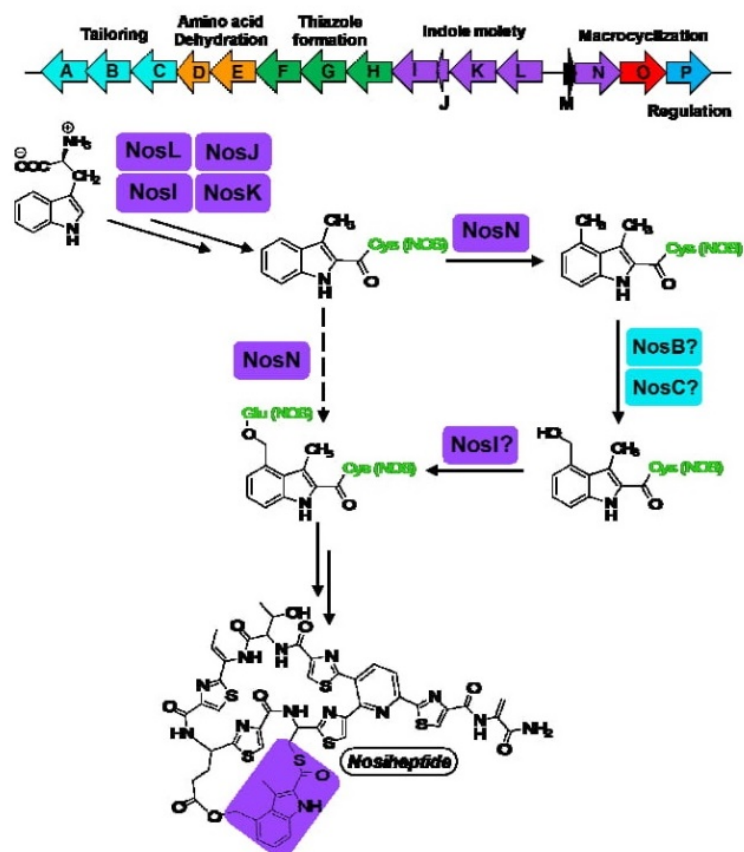


Figure 3 : Schéma proposé par Lamattina et al pour la synthèse de la chaîne indolique du Nosiheptide (5).

La production du nosiheptide est un processus complexe qui fait intervenir un grand nombre de protéines regroupées dans l'opéron NOS (voir figure 3) (19). La protéine NosM correspond au peptide précurseur du nosiheptide qui sera ensuite abondamment modifié par l'intervention de toutes les autres protéines. Sa région « core peptide » riche en cystéines va donc constituer le nosiheptide après modifications post-traductionnelles. La partie leader qui permet la reconnaissance par les enzymes de modification sera clivée lors des dernières étapes de maturation (figure 2B). La protéine NosL est responsable de la production, à partir de L-tryptophane, de l'acide 3-méthyl-2-indolique (MIA), qui est ensuite pris en charge par la protéine NosI (acyl-transférase ATP-dépendante) pour le transférer sur le

groupement thiol de l'extrémité du bras panthetéine de la protéine transporteur NosJ (famille des acyl carrier proteins). Il est ensuite proposé que la protéine NosK prenne en charge le fragment MIA pour l'insérer dans le nosiheptide en cours de maturation. La protéine NosN interviendrait à ce stade pour insérer un groupement méthyl en position 4 et former la liaison C-O de l'ester avec l'acide glutamique. Les protéines NosL et NosN font partie de la très vaste famille des protéines à radical S-adénosyl-L-méthionine (SAM). Par ailleurs, NosD, E, F, G, H, et O sont responsables de la formation du macrocycle central. NosD et NosE sont des déshydratases, NosF est une déhydrogénase, NosH et NosG des cyclodéhydratase (20). NosO est probablement une diels-alderase responsable de la formation du cycle pyrimidine central (20). De manière synthétique, les protéines NosF, NosG et NosH sont responsables de la formation des cycles thiazole tandis que NosD et NosE vont venir réaliser des déshydratations sur les acides aminés du macrocycle central (21). D'autre part, NosA, B et C sont responsables de modifications post traductionnelles de cette structure centrale. NosA n'a pas de fonction connue alors que NosB et C sont des cytochromes P450, pouvant réaliser des oxydations, notamment sur la pyridine centrale modifiée en hydroxypyridine. NosB et NosC sont donc des cibles intéressantes de bioingénierie pour rendre le nosiheptide plus soluble, via des oxydations permettant de diminuer sa lipophilie. NosP correspond à la protéine régulatrice de l'opéron NOS qui contrôle l'expression de chacune des protéines de l'opéron. Les mécanismes exacts des réactions catalysées sont complexes et pour la plupart non connus (19,21–23).

1.2 Le cas de NosL, une protéine à radical SAM

1.2.1 Les protéines à radical SAM :

Les protéines à radical SAM forment une superfamille d'enzymes qui utilisent un centre fer-soufre réduit $[4Fe-4S]^+$ pour réaliser le clivage homolytique de la liaison C5'-sulfonium de la *S*-adénosyl-L-méthionine (SAM) et produire de la L-méthionine ainsi que l'espèce radicalaire 5-deoxyadensyl hautement réactive (Figure 4) (24). Cette dernière, en arrachant un atome d'hydrogène spécifique du substrat, permet aux différentes enzymes de cette superfamille de réaliser de nombreuses réactions atypiques via la chimie radicalaire. Les réactions catalysées sont diverses et variées, comme par exemple des insertions d'atomes de soufre sur des carbones non activés, des oxydations, des cyclisations, des coupures de liaison C-C, des C-méthylations sur des positions non activées ou bien des épimérisations sélectives. Ces protéines sont retrouvées à des étapes clé de biosynthèse de nombreux cofacteurs, mais aussi dans la modification d'ARN, de protéines ou la réparation d'ADN. Depuis quelques années, de plus en plus de protéines à radical SAM sont identifiées dans la biosynthèse d'antibiotiques, et notamment dans la modification de peptides issues de la synthèse ribosomale aux propriétés antibiotiques, anticancéreuses ou antidouleur (24,25).

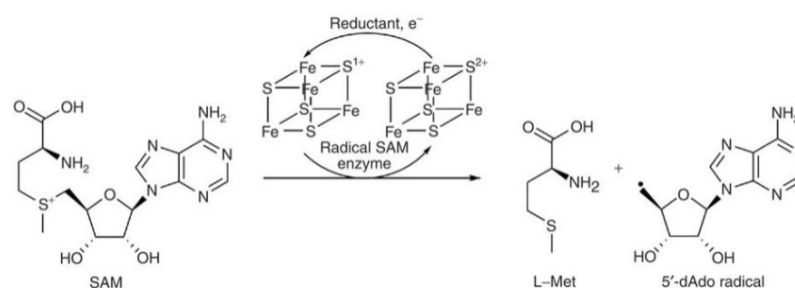


Figure 4 : réaction catalysée par les enzymes à radical SAM, conversion du SAM en L-Met et radical 5'dAdo (10).

Les réactions catalysées par les enzymes à radical SAM sont très particulières et généralement très difficiles voire impossible en chimie organique classique. Plus de 130 000 enzymes appartenant à la classe des protéines à radical SAM ont été découvertes à l'heure actuelle et sont retrouvées dans tous les organismes vivants.

Les réactions catalysées nombreuses et variées témoignent d'une adaptation évolutive.

1.2.2 La protéine NosL

- Structure de NosL :

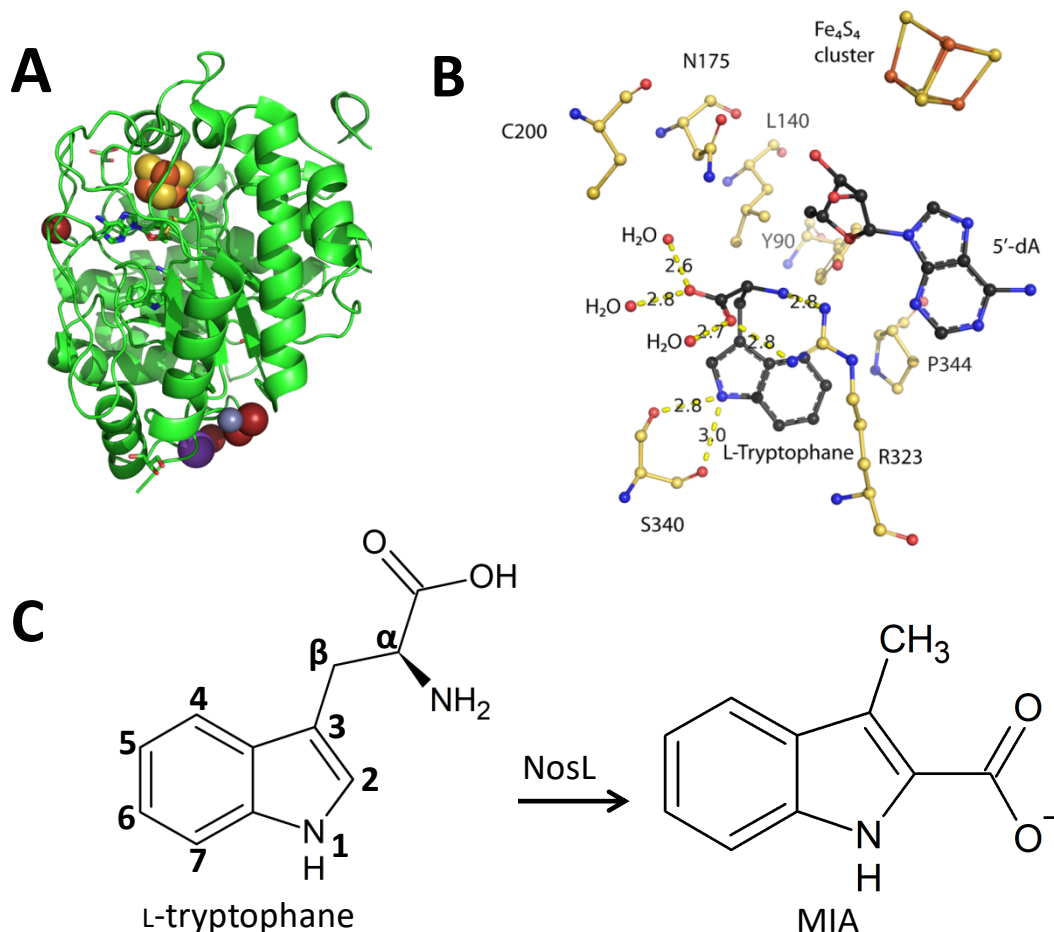


Figure 5 : (A) Structure de NosL montrant le cluster Fe_4S_4 et le site de liaison du L-Tryptophane. (B) vu détaillée du site actif et des interactions entre les ligands en noir et les acides aminés en jaune. PDB 4R34. (C) Réaction catalysée par NosL : conversion du L-tryptophane en Acide 3-méthyl-2-indolique.

La protéine NosL est un homodimère, chaque monomère possédant un centre fer-soufre responsable de l'initiation de la réaction radicalaire. En 2011, Zhang et al ont montré que la protéine à radical SAM NosL permet la synthèse de l'acide 3-méthyl-2-indole (MIA) à partir de L-tryptophane. Du fait de la prépondérance en biologie des radicaux tyrosyl et tryptophanyl localisés sur les cycles aromatiques et de la proximité

de séquence entre NosL et la tyrosine lyase ThiH responsable de la coupure de la liaison C α -C β de la L-tyrosine pour produire du *p*-crésol et de la déhydroglycine, les auteurs ont proposé que l'abstraction de l'hydrogène initial sur le L-tryptophane se fasse sur l'azote du cycle indole (voir figure 6). La structure cristalline de la protéine en complexe avec son substrat, le L-tryptophane, a permis de montrer que cette affirmation était erronée et que cette abstraction se produit au niveau de l'azote de la fonction amine du substrat. Ceci a été confirmé par des études en solution utilisant des analogues de substrat substitués (26). Sur la base de la détection, *in vitro* de méthylindole et de glyoxylate, présentés comme deux produits de shunt, les travaux initiaux avaient proposé, ensuite, un mécanisme de fragmentation-recombinaison impliquant un clivage de la liaison C α -C β et la recombinaison d'un fragment glycyyl sur la position 2 du cycle indole via le groupement carboxyl (27). En 2016, Sicoli et al (28) ont pu mettre en évidence, grâce à la caractérisation par résonance paramagnétique électronique (RPE) d'un intermédiaire de réaction, un nouveau mécanisme réactionnel, impliquant, au lieu de la coupure C α -C β , la rupture de la liaison C α -COOH avec une migration directe du carboxyl vers la position 2 de l'indole (voir figure 7 et 8). Il avait alors été conclu que l'enzyme peut cliver la liaison C α -COOH pour conduire au MIA, mais qu'elle peut aussi, dans certaines conditions couper la liaison C α -C β . Cette dernière réaction serait un héritage évolutif issu d'une enzyme ancestrale ayant conduit d'un côté aux tyrosines lyases (qui coupent la liaison C α -C β de la tyrosine pour produire de la déhydroglycine) et de l'autre à NosL. En 2018, Bhandari et al, grâce à l'utilisation d'un analogue du L-tryptophane dont le carboxyl a été remplacé par un groupement thiocarboxyl, ont confirmé cette migration de carboxyl. Par ailleurs, ils n'ont pas été capables de détecter de trace de glyoxylate, molécule préalablement

proposée comme produit de shunt à l'origine de la proposition de coupure de la liaison C α -C β . Ils ont ainsi suggéré que cette coupure de la liaison C α -C β initialement proposée n'avait en fait pas lieu en début de réaction, mais plus tard dans la réaction, permettant l'élimination du fragment C α -N sous forme d'un ion cyanure, après migration du groupement carboxyl comme cela est décrit dans la figure 9 (29).

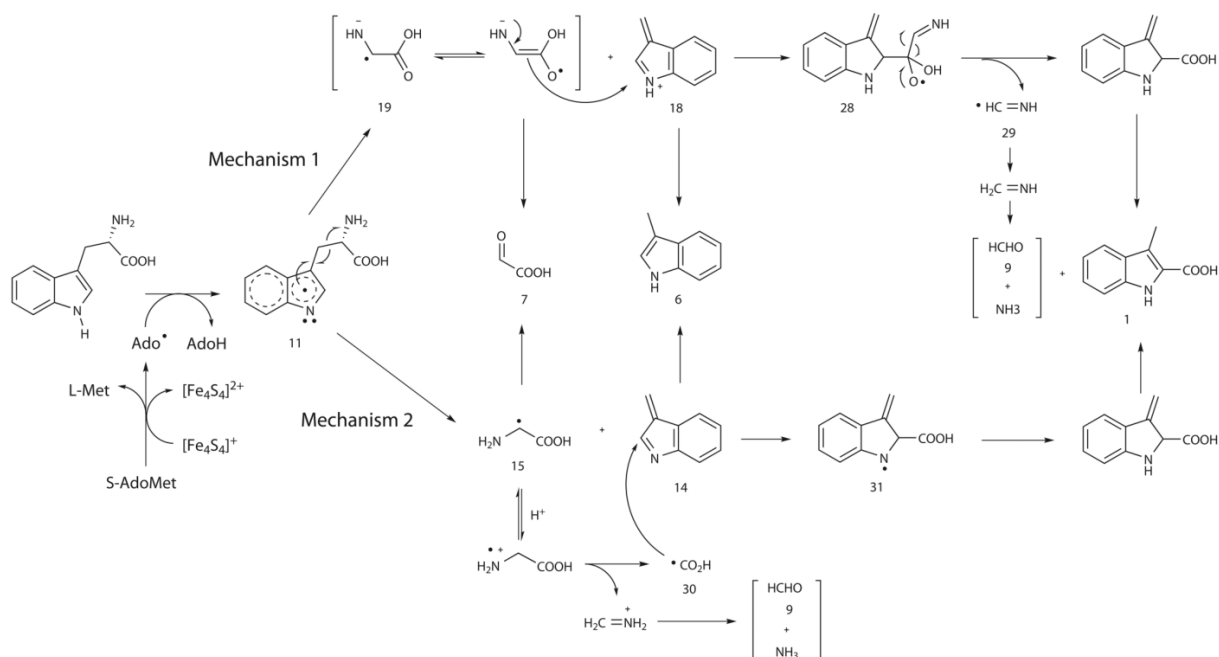


Figure 6 : mécanisme proposé par Zhang et al en 2011 pour la réaction catalysée par NosL.

Pour le mécanisme 1, la recombinaison pourrait prendre place entre l'espèce cationique 18 et la molécule radicalaire 19 suivi par l'élimination de l'unité C α -N à partir de l'espèce radicalaire résultante 28. Pour le mécanisme 2, la molécule radicalaire 15 pourrait subir une seconde fragmentation pour générer un radical carboxylique en 30 avant son addition sur la molécule 14.

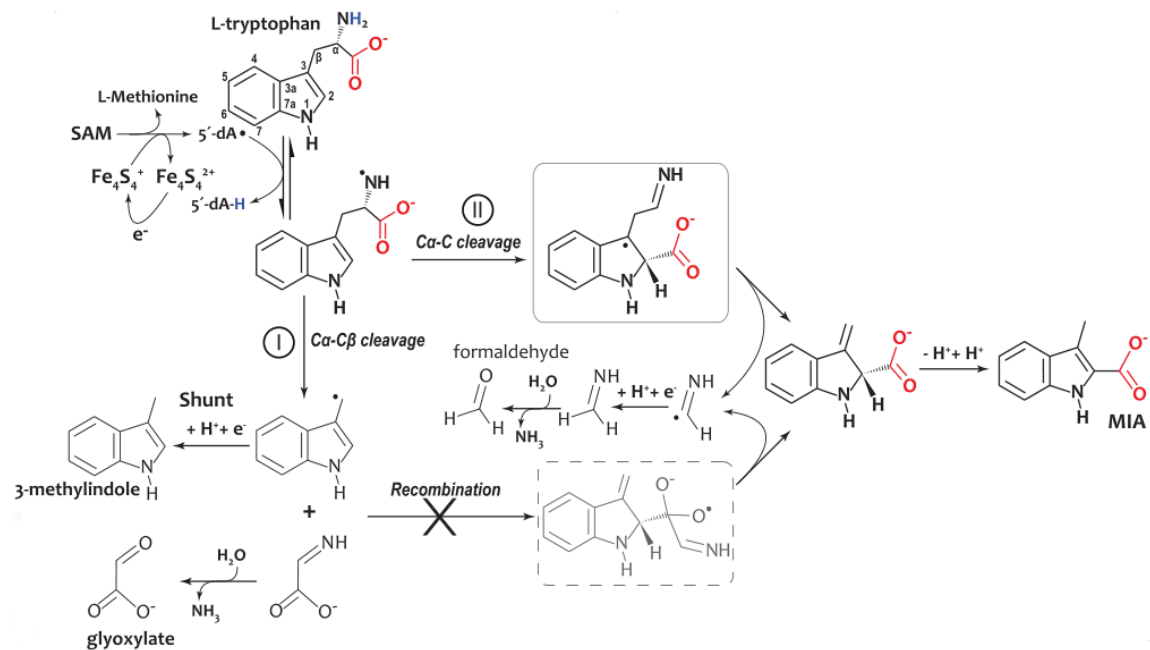


Figure 7 : Mécanismes catalysés par NosL pour la synthèse du MIA. D'après Sicoli et al, 2016.

La voie I correspond au mécanisme de fragmentation recombinaison proposé précédemment par Zhang et al (29) : ces hypothèses ont pu être établies sur la base des produits annexes générés lors de la catalyse par l'enzyme, notamment le 3-méthylindole et le glyoxylate. Elles sont réfutées par Sicoli et al (27) qui proposent un mécanisme réactionnel différent, représenté sur la voie II. Le mécanisme proposé mène au MIA mais sans impliquer de recombinaison et en réalisant deux scissions β radicalaires. Le radical détecté par RPE ne se trouve pas sur l'azote indolique en position 1 mais sur le carbone 3 comme représenté sur la figure 9, ce qui réfute l'hypothèse de Zhang et al concernant une coupure C α -C β .

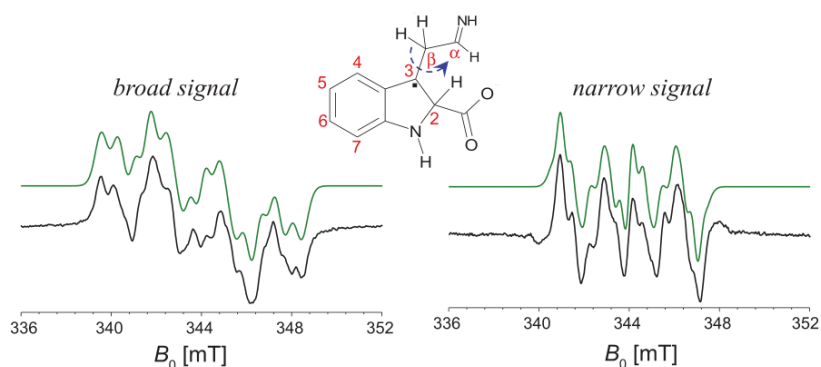


Figure 8 : Intermédiaire réactionnel radicalaire détecté par RPE. Sicoli et al, 2016.

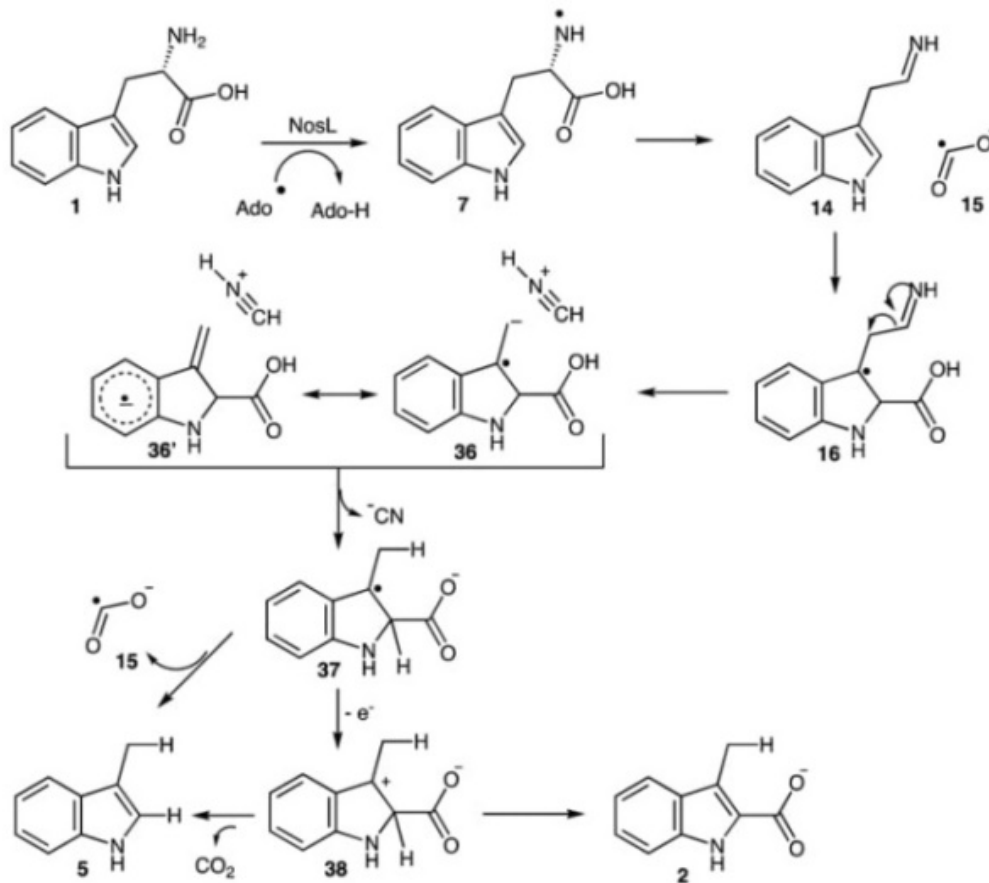


Figure 9 : Mécanisme proposé pour la conversion du L-tryptophane en MIA par NosL, en accord avec la production d'un cyanure (B). Bhandari et al, 2018. Bhandari et al n'ont pas réussi à reproduire les résultats de Zhang et al (30) montrant la production de glyoxylate comme produit de shunt ni de formaldéhyde comme sous-produit, mais ils ont, en revanche montré la production de cyanure. A la lumière de ces résultats, Bhandari et al (28) ont proposé une variante du mécanisme B et ont définitivement invalidé le mécanisme A (figure 8B). Dans ce mécanisme, le radical amine formé initialement subit une scission β pour former le composé **14** et le radical carboxyl **15**, qui est ajouté au C2' du groupe indolique pour former le composé **16**. La perte de H_2CN^+ par une seconde β scission non radicalaire cette fois ci, donne le composé **36** (28), un nouveau composé correspondant à un méthylindole radicalaire. Ainsi, l'élimination de formaldéhyde précédemment proposé par Sicoli et al est invalidée : seul du CO_2 et du cyanure sont retrouvés comme produit d'élimination.

Toutefois, aucune information n'est disponible pour comprendre comment ce cyanure est formé, ni comment la réaction peut ensuite bifurquer *in vitro* pour produire soit du MIA, soit du méthylindole (MI). Au laboratoire, un certain nombre de variants de NosL sont disponibles afin de piéger de nouveaux intermédiaires de réaction et ainsi progresser dans notre compréhension du mécanisme de la protéine. Par ailleurs, la protéine étant promiscue pour son substrat, elle semble adaptée pour servir de matrice pour des expériences de mutagenèse aléatoire et criblage haut débit de variants capable d'accueillir de nouveaux substrats. Outre une source potentielle d'information supplémentaire pour la compréhension du mécanisme de l'enzyme native, ces travaux permettraient de mettre au point des protocoles expérimentaux pour le développement de chimères à usage industriel ou en biologie de synthèse pour la production de molécules d'intérêt.

Matériel et méthodes :

A] Principes généraux de la cristallographie

La cristallographie des protéines est la méthode la plus utilisée pour la résolution de structures de macromolécules. Elle implique dans un premier temps la cristallisation des protéines puis la diffraction des rayons X ou des neutrons et la résolution de structures. Différentes méthodes de cristallisation sont utilisées, notamment la technique de la goutte suspendue qui permet de cristalliser les protéines sur des lamelles, au-dessus de puits contenant des solutions précipitantes.

1.1 Cristallisation des protéines :

1.1.1 Diagramme de phase :

Les méthodes utilisées pour cristalliser les protéines sont nombreuses et variées, témoignant de la difficulté pour obtenir des cristaux de protéines. Il est nécessaire d'avoir des cristaux de bonne qualité, avec une taille suffisante de l'ordre de la centaine du micron. Les protéines ne cristallisent pas spontanément, il est nécessaire de créer des conditions favorables à ce type d'organisation moléculaire : la protéine est concentrée dans un milieu tamponné, puis elle est mélangée avec un précipitant permettant la cristallisation, avec éventuellement des sels supplémentaires et à un pH maîtrisé. Les artefacts sont nombreux et il n'est pas toujours possible de trouver des conditions pour cristalliser une protéine donnée. Ainsi, des centaines de conditions sont en général testées puis optimisées avant de pouvoir produire des cristaux de protéines.

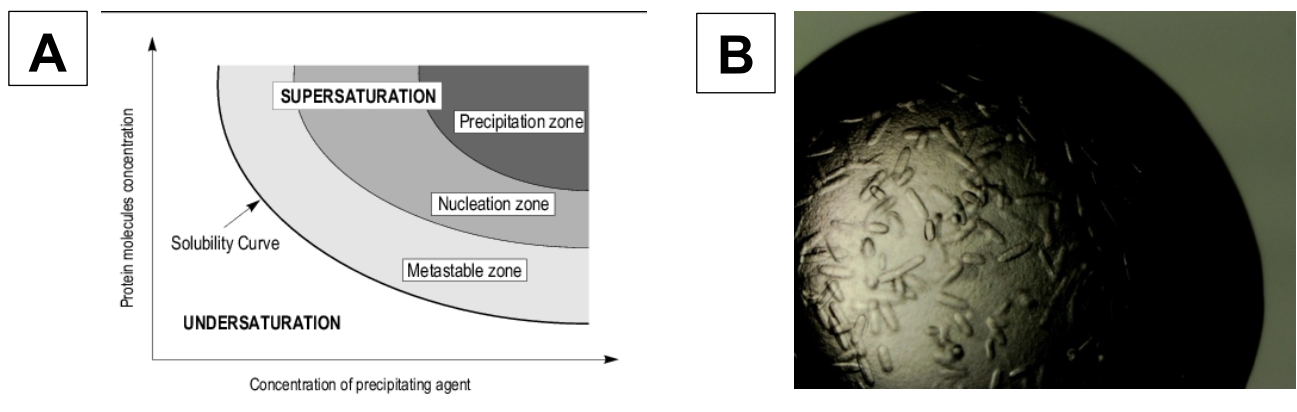


Figure 10 : Diagramme de phase pour la cristallisation des protéines (A) et exemple de cristaux d'Acétylcholinestérase humaine (B). (A) Adapté des cours de cristallographie des Mines d'Albi.

Le diagramme de phase illustre la particularité des conditions nécessaires à la cristallisation des protéines (30). La courbe de solubilité divise la concentration en 2 aires : la zone non saturée et la zone en supersaturation. Chaque point de la courbe correspond à une concentration à laquelle la solution est en équilibre avec l'agent précipitant. Cela correspond à la situation en fin de croissance cristalline à partir d'une solution supersaturée ou à une situation dans laquelle le cristal se dissout dans la zone non saturée. Ainsi, dans la zone non saturée, la cristallisation n'est pas possible. Au-dessus de la courbe de solubilité, la zone de supersaturation peut elle-même être divisée en trois zones :

- La zone de précipitation où l'excès de protéine se sépare immédiatement de la solution pour former des agrégats amorphes
- La zone de nucléation où la protéine peut former des germes de cristaux
- La zone métastable supersaturée qui ne forme pas de cristaux durant une longue période, à moins qu'un phénomène ne vienne perturber cet équilibre comme l'introduction d'un cristal.

1.1.2 Méthode par diffusion de vapeur :

La diffusion de vapeur est la méthode la plus utilisée pour la cristallisation des protéines ; en particulier la méthode dite de la goutte suspendue (voir figure 11) (30). Comme nous l'avons vu précédemment dans le diagramme de phase, les cristaux de protéine ne peuvent apparaître que dans des conditions très particulières qui correspondent à la zone de nucléation dans une solution hypersaturée contenant un précipitant et la protéine. Toute la difficulté est d'amener la solution vers des conditions correspondant à la zone métastable et à la zone de nucléation. La goutte suspendue

est adaptée à ces besoins. Dans cette technique, une solution de protéine est mélangée avec une solution de précipitant pour former une goutte placée en équilibre de vapeur avec un réservoir de précipitant (figure 11). Le puit est fermé hermétiquement car la lamelle sur laquelle est posée la goutte est retournée sur le côté du puit contenant le précipitant, et scellée par de la graisse. La goutte a une concentration plus faible en précipitant que le réservoir. Pour atteindre l'équilibre, de l'eau va s'évaporer de la goutte ce qui va augmenter la supersaturation. L'équilibre est atteint quand la concentration en précipitant dans la goutte est la même que celle dans le réservoir.

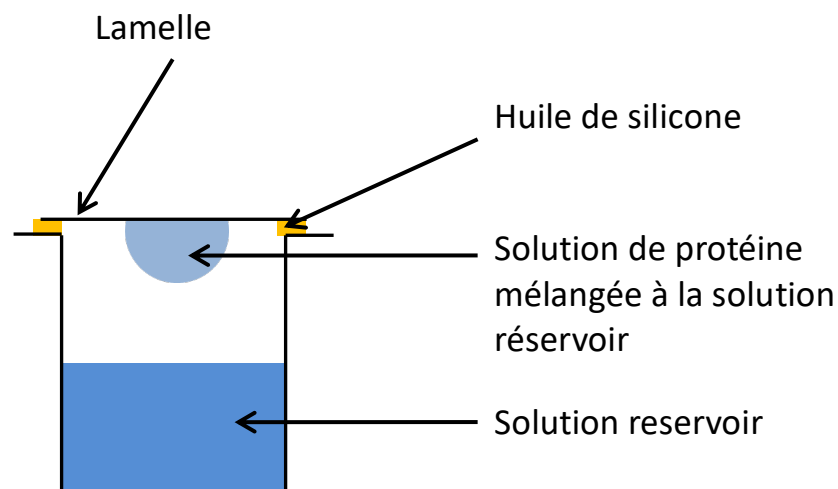


Figure 11: Technique de la goutte suspendue

1.2 Diffraction des cristaux de protéines :

1.2.1 Symétrie des cristaux :

Les structures cristallographiques ont une apparence externe fascinante correspondant à un arrangement ordonné des atomes. Les cristaux minéraux en particulier intéressent les hommes depuis la nuit des temps et peuvent posséder de grandes valeurs monétaires (diamants...). Le cristallographe doit être en mesure

d'apprécier la symétrie des cristaux en vue de leur étude, car les résultats cristallographiques en sont directement dépendant tout comme la méthode de diffraction à utiliser. La répétition des atomes dans l'espace tridimensionnel est à l'origine de la périodicité spatiale, définissant la symétrie cristalline. Un objet est considéré comme symétrique si après plusieurs opérations réalisées dans les 3 dimensions, le résultat est identique à l'objet de départ. Trois translations peuvent définir un espace tridimensionnel appelé unité asymétrique et qui correspond à l'unité minimale permettant de reconstruire le cristal. La maille élémentaire, quant à elle, est définie par les distances a , b et c représentant le déplacement le long des trois axes et les angles α , β et γ et permet de reproduire le motif cristallin à l'infini par des translations. Auguste Bravais est à l'origine de la classification actuelle : toutes les symétries possibles sont classifiées dans 14 réseaux de Bravais qui s'additionnent aux 7 formes primitives. Des groupes d'espaces multiples avec une symétrie unique sont compris dans chaque réseau, ce qui porte à 230 le nombre d'organisations possibles au sein d'un cristal de macromolécules (4).

1.2.2 Principes physiques de la diffraction

- *Loi de Bragg :*

La diffraction des cristaux observée pour la première fois par Max von Laue en 1913 peut être interprétée par la loi de Bragg, décrite par William Lawrence Bragg en 1913. Elle permet de trouver comment la diffraction d'une onde sur chaque objet composant une maille peut être en phase. La première partie de la loi de Bragg s'écrit ainsi :

$$n\lambda = 2d \sin \theta$$

Avec n correspondant à l'ordre de diffraction, λ la longueur d'onde des rayons x , d l'espacement entre deux plans cristallins ou (distance interréticulaire) et θ l'angle de Bragg qui représente l'angle entre la maille et l'onde incidente. Cela est représenté de manière schématique sur la figure 12, où nous voyons des rayons x incidents diffracter sur un plan cristallin. Pour obtenir la diffraction, il faut que les ondes reflétées soient en phase. En cristallographie des macromolécules, la longueur d'onde sera généralement de l'ordre de l'angström ce qui permettra de recueillir des informations sur la structure des cristaux et les angles sont déterminés expérimentalement.

Les plans réticulaires peuvent être décrits par des vecteurs de l'espace réciproque (figure 12):

$$\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \text{ avec } \frac{\lambda}{2} > d_{hkl}$$

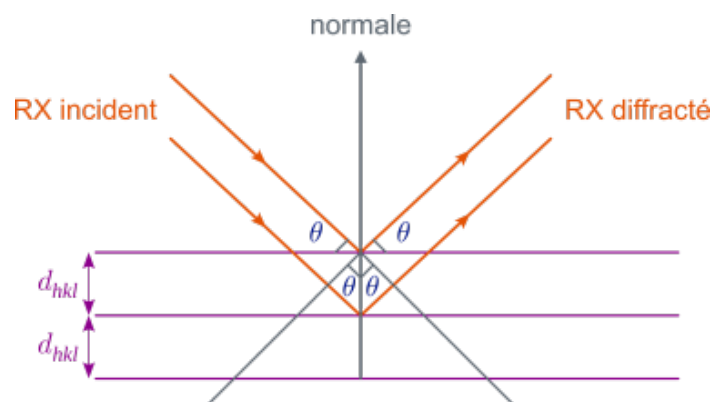


Figure 12 : Représentation vectorielle de la loi de Bragg. Extraits des cours de cristallographie des mines d'Albi.

Ainsi, ces vecteurs du réseau réciproque identifiés par leur indices de Laue (hkl) peuvent être utilisés pour énumérer toutes les diffractions possibles par un cristal (31). Ils sont appelés indices de diffractions et un plan réticulaire d_{hkl} peut être associé avec

chaque série d'indice : \vec{H}, \vec{K} et \vec{L} , correspondent aux vecteurs du réseau réciproque. Nous n'aborderons dans cette thèse que la diffraction monochromatique aux rayons X : nous travaillons à λ fixe. Par conséquent, l'angle θ peut être retrouvé à l'aide de la loi de Bragg et l'équation peut ainsi être réarrangé sous la forme :

$$\sin \theta = \lambda/2d_{hkl}$$

- *Espace réciproque et sphère d'Ewald :*

La diffraction des ondes par un motif cristallin donne un cliché de diffraction qui correspond à la projection d'une partie de l'espace réciproque sur le détecteur. Les espaces réels et réciproques sont directement liées et les vecteurs de l'espace réciproque peuvent être retrouvés par le produit scalaire des équations ci-dessous :

$$\vec{a1}^* = \frac{\vec{a2} \times \vec{a3}}{a1 \cdot (a2 \times a3)}$$

$$\vec{a2}^* = \frac{\vec{a3} \times \vec{a1}}{a2 \cdot (a3 \times a1)}$$

$$\vec{a3}^* = \frac{\vec{a1} \times \vec{a2}}{a3 \cdot (a1 \times a2)}$$

Avec $(\vec{a1}^*, \vec{a2}^* \text{ et } \vec{a3}^*)$ définissant la maille de l'espace réciproque. La construction d'Ewald permet de décrire la diffraction par un cristal, en déterminant les points du réseau réciproque donnant lieu à une diffraction.

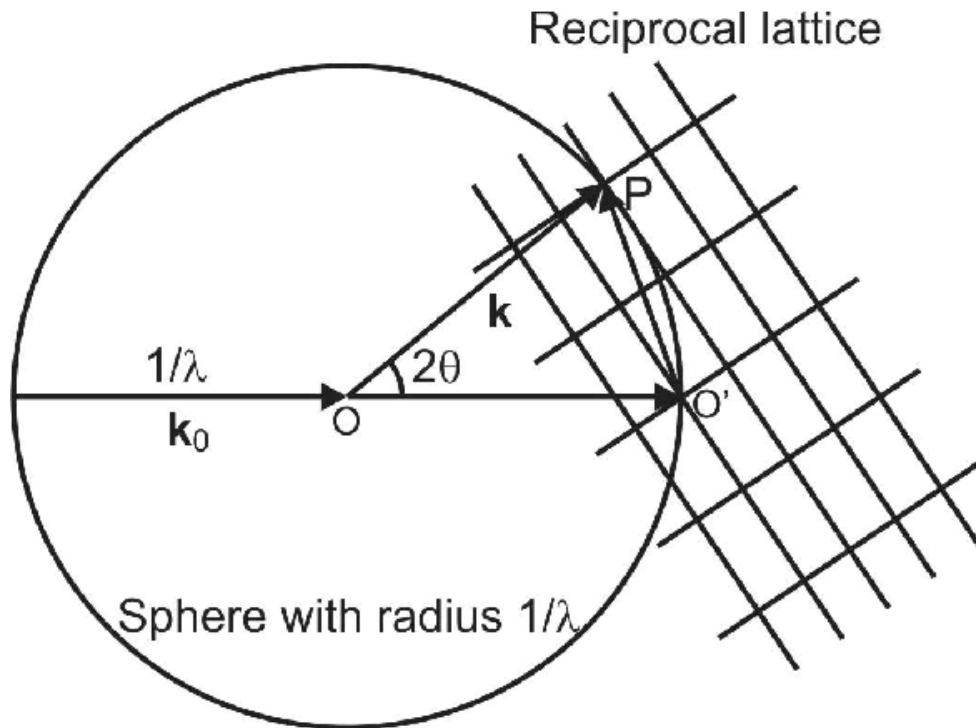


Figure 13 : représentation de la sphère d'Ewald. Extrait de X-Ray scattering. Ungar et al, 2014.

La sphère d'Ewald correspond à la construction d'une sphère de rayon $1/\lambda$ (32). Une diffraction se produit à chaque fois que le rayon de la sphère croise un vecteur de l'espace réciproque, comme en P et O' sur la figure. Cela illustre l'importance de faire tourner le cristal lors de l'acquisition des données afin d'obtenir toutes les tâches de diffraction possibles et ainsi de collecter des données complètes. Dans le cas le plus général, une acquisition pendant une rotation de 180° est nécessaire pour obtenir un jeu complet de données.

- *Synthèses de Fourier en trois dimensions et facteur de structure :*

En cristallographie, les coordonnées x , y et z représentent les coordonnées fractionnelles d'un point dans une maille. Ces coordonnées sont définis par rapport

aux 3 vecteurs de base de la maille élémentaire a, b et c. Les facteurs de structure décrivent de manière mathématique la manière dont une onde incidente est diffractée par un objet, c'est-à-dire par la densité électronique d'un atome dans le cas des rayons X. La formule en trois dimensions du facteur de structure est notée de la manière suivante :

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \exp [i\varphi_{hkl}]$$

Soit

$$F_{hkl} = \iiint_0^1 \rho(x, y, z) \exp [2\pi i(hx + ky + lz)] dx dy dz$$

V représente le volume de la maille. Cela est exprimé du fait que la densité électronique est un nombre d'électrons par unité de volume, tandis que le facteur F est normalement exprimé comme un nombre d'électron dans une maille. La fonction $\rho(x, y, z)$ représente la densité électronique de tous les atomes de la maille élémentaire.

1.3 Approche pratique de la cristallographie macromoléculaire :

1.3.1 Sources de rayons X

Il existe différentes manières pour produire des rayons X. La méthode historique et disponible en laboratoire utilise un tube aux rayons X sous vide, avec le bombardement d'une cible métallique par des électrons. Les électrons sont produits par une cathode avec un potentiel largement inférieur à celui de l'anode métallique, ce qui génère assez d'énergie pour produire des photons X lors de l'impact des électrons sur l'anode. Cette méthode n'est actuellement que peu utilisée en

cristallographie des protéines, depuis l'apparition de nombreux synchrotrons accessibles et performants dans les pays développés. Ainsi, nous ne nous décrivons que le fonctionnement des synchrotrons dans le cadre de cette thèse d'exercice.

1.3.2 Sources synchrotrons :

Depuis les années 1960, les sources synchrotrons (figure 14) se sont développés de manières importantes et permettent la génération de rayons X très intenses. Ce sont de grands instruments dans lesquelles des électrons circulent dans le vide, déviés par des champs magnétiques maintenant les électrons sur une trajectoire circulaire à une vitesse proche de la vitesse de la lumière. Lorsque les électrons sont déviés de manière tangentielle, des faisceaux rayons X intenses sont émis. Des variations de trajectoires peuvent être produits par des dispositifs répartis le long du faisceau d'électrons: les « insertions devices » et les aimants de courbures « bending magnet ». Cela permet de produire des faisceaux de rayons X possédant des caractéristiques propres à chaque station expérimentale, dont notamment celles de cristallographie macromoléculaire (4).

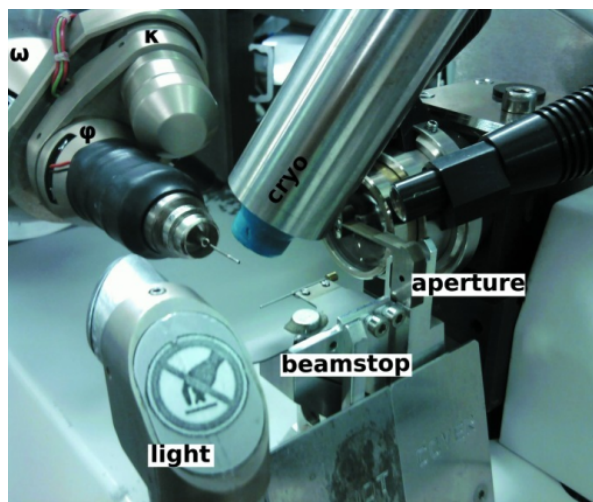
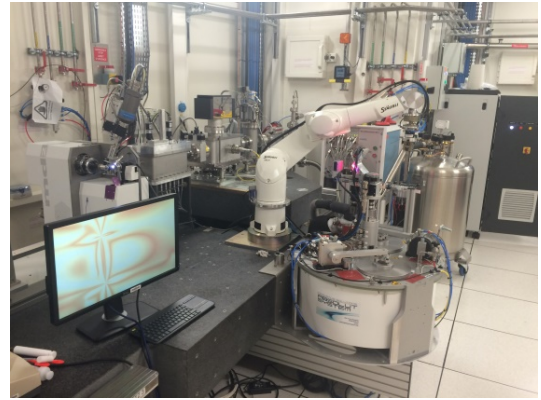


Figure 14: L'European Radiation Facility, la station expérimentale de la ligne de lumière ID30A-3 et une vue détaillée de la ligne ID29.

1.3.3 Analyse des données de diffraction :

Une fois que les cristaux ont été exposés et les données collectées, il est nécessaire de retrouver et de prédire la position des réflexions sur les clichés de diffraction puis de déterminer le groupe d'espace du cristal et l'orientation du cristal afin de pouvoir mesurer l'intensité des réflexions identifiées par leur indice de Laue (hkl).

- Indexation :

L'indexation permet de trouver les paramètres de maille (a, b, c et angles α , β , γ) et l'orientation du cristal sur le diffractomètre. Cela permet ensuite de prédire la position des pics de diffraction sur chaque image.

- *Intégration :*

L'intégration permet de mesurer l'intensité des réflexions sur chaque image.

- *Mise à l'échelle :*

Une variation des paramètres expérimentaux lors de la collecte comme une variation de l'intensité ou du volume du cristal exposé peut rendre les clichés de diffraction non comparable entre eux. Pour cette raison, il est nécessaire de procéder à une mise à l'échelle après avoir réalisé l'indexation et l'intégration des données.

- *Problème de la phase :*

Sur le détecteur, on ne mesure que l'intensité d'une réflexion, pas la phase. Si nous reprenons l'équation de l'intégration des pics de Bragg nous obtenons :

$$F(\vec{H}) = |F(\vec{H})|e^{i\varphi(\vec{H})} \text{ et } I \approx |F|^2$$

L'intensité est mesurée pour chaque pic de Bragg mais la phase φ est manquante pour pouvoir remonter directement à la densité électronique. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser des techniques de diffusion anormale ou de remplacement moléculaire. Ces procédés sont très utilisés et robustes, les principes physiques ne seront pas abordés ici car ils dépassent le cadre de cette thèse d'exercice mais nous noterons toutefois que c'est la transformé de Fourier qui permet de remonter à la densité électronique et à la structure du cristal.

- *Affinement de la structure :*

Une fois que la phase a pu être retrouvée, la structure peut être résolue à partir de la carte de densité électronique. La densité électronique est interprétée par rapport à la séquence de la protéine présente. Finalement, la structure est vérifiée manuellement : chaque acide aminé est vérifié et corrigé si nécessaire. Les densités électroniques non expliquées par un acide aminé sont modélisées, il peut s'agir par exemple d'eau ou de précipitant. Différents indicateurs permettent d'évaluer les corrections effectuées, dont notamment le facteur R qui doit diminuer lors de l'affinement de la structure.

B] Matériel et méthode des expériences réalisées :

1.1 Production de NosL et de ses mutants :

NosL est une protéine sensible à l'oxygène, sa production, conservation et manipulation doivent donc se faire en anaérobie dans des boîtes à gant. Une image de chaque boîte à gant permet de mieux visualiser la mise en place des différentes expériences (figures 16 à 18).

1.1.1 Préparation du plasmide :

Les plasmides de NosL WT et des différents mutants sont préparés à partir d'oligonucléotides commandés chez Eurofins (voir tableau 2). Les oligonucléotides sont tout d'abord dissous à une concentration de 100 μM puis dilués au 1/10^{ème} dans de l'eau distillé et stérile.

Afin de produire des variants de NosL par mutagenèse dirigée, les oligonucléotides contenant la modification sont utilisés comme amorce pour amplifier le gène de NosL par PCR, tout en introduisant la mutation choisie, en utilisant la

methode Quikchange. Le plasmide NosL WT est utilisé comme matrice. Les produits de PCR, après digestion du plasmide parental par l'enzyme de restriction DpnI, sont introduits dans des cellules *E. coli* DH5 α en milieu de Luria-Bertani.

Protocole de la PCR : dans un tube pour PCR, il est mélangé 35 μ L d'eau, 10 μ L de tampon HF (Thermo Scientific™ F538L), 1 μ L de dNTP (Thermo Scientific™ R0181), 1.5 μ L de chaque oligonucléotide à 10 μ M, 1 μ L de plasmide de NosL SA et enfin 0.5 μ L de Phusion polymérase HS (New England Biolabs, M0530S). Le cycle de PCR est alors initié : 98°C durant 5 min, puis 35 cycles avec une température de 98°C 30s, 65°C 30s et 72°C 2.5 min. Le cycle se finit par 10 min à 72°C puis stockage à 4°C. Un échantillon est alors prélevé et envoyé à séquencer.

Une digestion par l'enzyme de restriction DpnI est alors réalisée pour se débarrasser de l'ADN parental, sans cibler le produit de la PCR. Pour cela, 50 μ L de produit PCR est mélangé avec 3 μ L d'eau, 6 μ L de tampon 6x pour DpnI et 1 μ L de DpnI (New England Biolabs, R0176S) puis incubation 1H00 à 37 °C.

Enfin, une transformation de cellules *E. coli* DH5 α est réalisée, en mélangeant 10 à 20 μ L du produit de digestion à 100 μ L de cellules chimio-compétentes, puis incubation de 45 min dans la glace. Les cellules subissent ensuite un choc thermique à 42 °C pendant 45s puis de nouveau 3 min dans la glace. 250 μ L de milieu LB est alors ajouté puis les cellules sont incubées 1H00 à 37 °C et centrifugées pour éliminer le milieu de culture et resuspendre les cellules dans 100 μ L de milieu LB. Le plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline ce qui permet dans un second temps de sélectionner les cellules ayant incorporé le plasmide. Pour cela, la suspension comprenant les cellules est déposée sur une gélose d'agar-agar enrichie en ampicilline puis incubée sur la nuit à 37 °C. Une colonie est mise en culture liquide le

lendemain pour ensuite extraire l'ADN plasmidique avant vérification de la présence de la modification par séquençage.

Nom de l'oligonucléotide	Séquence
NosL P344G-f	CCGGGCTCCGGGGATGTTGCTCC (24)
NosL P344G-r	GGAGCAACATCCCCGGAGCCCGG (24)
NosL Y90-f	TGTTCCGCTGTTTACCACGAACT (23)
NosL Y90-r	AGTTCGTGGTAAACAGCGGAACA (23)
NosL C200-f	CGGTGACGATGTCCGTTTTTCAAGAAA (27)
NosL C200-r	TTTCTTGAAAAACGGACATCGTCACCG (27)

Tableau 1 : Séquence des oligonucléotides des mutants de NosL

1.1.2 Culture et expression :

Le plasmide est inséré dans des cellules compétentes BL21(DE)3, contenant déjà un plasmide maison pRSFIsMetK résistant à la kanamycine. Ce dernier permet la coexpression des protéines de l'opéron ISC de *E. coli*, responsable de la synthèse et l'intégration des centres FeS dans les métalloprotéines. Il contient aussi le gène codant pour la protéine MetK qui est la SAM synthase d'*E. coli*. Une préculture est réalisée en milieu de Luria-Bertani enrichi en ampicilline et kanamycine. Les bactéries sont ensuite déposées dans un erlenmeyer avec 1800mL de milieu de culture Terrific Broth enrichi en ampicilline et kanamycine, avec incubation à 37°C jusqu'à atteindre une DO à 600 nm de 0.6. Dans une bouteille de 2L en conditions stériles, il est alors ajouté 1800mL de milieu de culture, 100mL de culture, 10 mL de vitamines MEM 100X (Sigma) et 50mL de MOPS 1M pH 7.4 filtré, les cultures sont alors basculées dans une boîte à gant anaérobie (figure 16). Le passage en anaérobie se fait en ouvrant les bouteilles et sous agitation. Il est alors ajouté 1mL de cystéine 0.5M, 1.5 mL de

méthionine 0.2M et 50 mL de fumarate 1 M. Ensuite, l'absorbance à 600 nm est de nouveau mesurée. Si celle-ci est supérieure à 0,8, 500 μ L de citrate de fer 1M et 2 mL d'IPTG 1 M sont incorporés. La production de la protéine recombinante est alors initiée par l'IPTG. Les bactéries sont laissées une nuit à 18 °C sous agitation. Le lendemain, les cultures sont arrêtées par centrifugation et sonication des culots. Le surnageant contenant la protéine est alors récupéré dans un tampon Tris 50mM NaCl 300mM pH8 et filtré.



Figure 15 : Boite à gant pour l'expression des protéines recombinantes

1.1.3 Purification :

La protéine recombinante est ensuite purifiée par chromatographie. La première étape de purification consiste à filtrer le surnageant à l'aide d'un filtre spécial dans une seringue afin d'éliminer les agrégats et particules qui pourraient endommager ou colmater les colonnes de chromatographie. Ensuite, une première étape de purification par affinité sur une colonne de nickel permet de récupérer la protéine. En effet, à l'extrémité N-terminale de la séquence de NosL, une séquence riche en histidines est ajoutée (étiquette 6-His ou His-tag). Celle-ci va permettre la fixation de la protéine sur les ions nickel, eux même attachés à une résine, puis être

éluée par compétition à l'aide d'une solution de tampon Tris 50mM, NaCl 500mM contenant 1 M d'imidazole à pH 8. Les fractions contenant la protéine sont déposées sur gel afin de choisir celles les plus pures qui seront conservées pour les étapes ultérieures. La seconde étape de purification consiste à désaler la protéine à l'aide d'une colonne HiPrep (Ge Healthcare) remplie de Sephadex. Les protéines sont éluées dans un tampon Tris 50mM, NaCl 300mM à pH 8, ce qui permet de réduire la quantité de sel et éliminer l'imidazole qui pourrait gêner les étapes suivantes. La protéine est ensuite concentrée puis le centre fer-soufre est restauré par ajout de fer et de soufre en léger excès (6X pour un centre Fe_4S_4). L'excédent de fer libre ainsi que les derniers contaminants sont éliminés lors de la dernière de purification par chromatographie d'exclusion sur résine Superdex 200. Les fractions les plus pures sont sélectionnées après analyse d'un gel d'électrophorèse. Pour finir, la protéine est concentrée à l'aide d'une membrane Amicon 10kD autour de 10mg/mL dans un tampon 50mM Tris, 150mM NaCl, 2mM DTT pH8 et stockée dans de l'azote liquide.

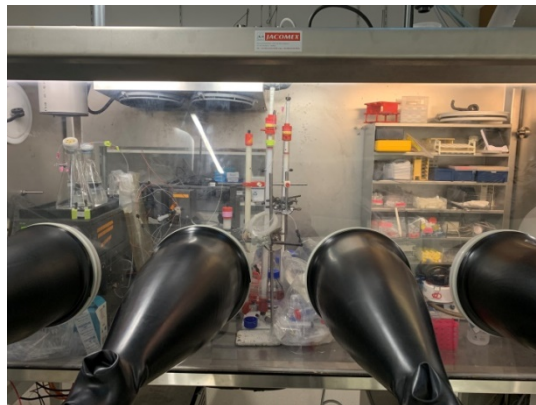


Figure 16 : Boite à gant dédiée à la purification des protéines

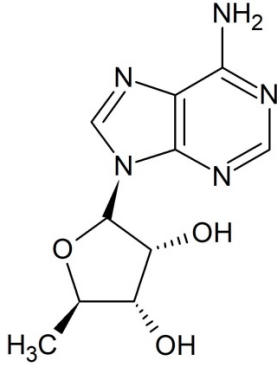
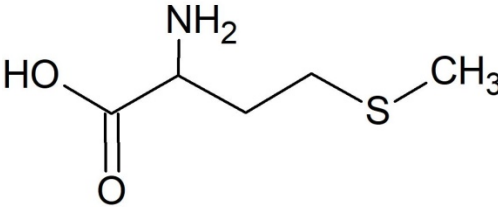
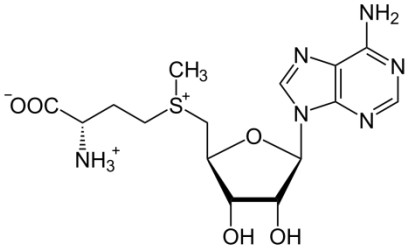
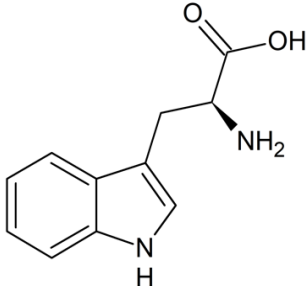
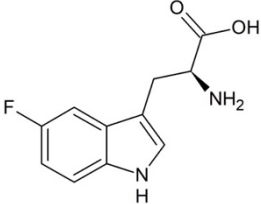
1.1.4 Cocrystallisation de NosL :

La protéine NosL et ses différents mutants sont co-cristallisés en présence de ligands par diffusion de vapeur, à l'aide de la méthode de la goutte suspendue (voir

matériel et méthodes) et en conditions anaérobies. Pour cela, les réservoirs sont remplis de solution précipitantes (200 mM NaBr, 10 à 26% de PEG3350). La solution de protéine est concentrée autour de 10 mg/mL et les différents ligands (voir tableau 2) sont incubés avant de faire les gouttes. 1.5 μ L de protéine et 1.5 μ L de solution précipitante sont mélangés sur une lamelle, ensuite retournée sur le puit. Nous avons décidé, en plus du ligand analogue du substrat, d'utiliser, soit de la 5'-deoxyadénosine et de la méthionine pour mimer les produits de clivage de la SAM, soit directement la SAM, en fonction des besoins de l'expérience.



Figure 17 : Boite à gant pour la cristallisation des protéines

Ligand	Nom	Concentration lors de l'incubation
	5'-déoxyadénosine	1 mM
	méthionine	1 mM
	S-adénosyl-L-méthionine	1 mM
	L-tryptophane	1 mM
	5-fluoro-L-tryptophane	5 mM

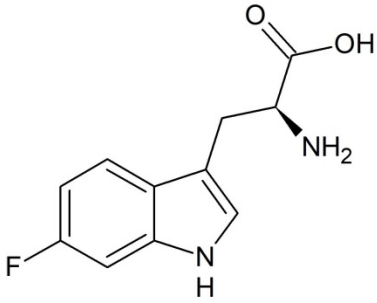
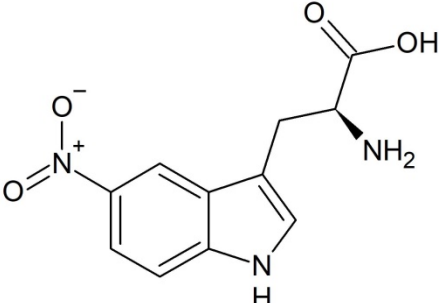
	6-fluoro-L-tryptophane	5 mM
	5-nitro-D/L-tryptophane	5 mM

Tableau 2 : composés co-cristallisés avec NosL et ses mutants

1.1.5 Congélation des cristaux :

Les cristaux sont congelés en condition anaérobie. Pour cela, le cristal est monté sur une boucle à l'intérieur de la boîte à gants, afin de prévenir tout dommage oxydatif avant congélation (33). Il est, au préalable trempé dans une solution de congélation contenant le ligand, 25 % de PEG 3350, 200 mM de NaBr et 23 % de glycérol. Ce dernier est utilisé comme agent cryo-protectant pour prévenir la formation de glace cristalline lors de la congélation. En effet, la présence de glace a un effet néfaste sur la qualité des données de diffraction car elle vient se superposer au signal issu de la diffraction du monocristal de protéine. Par ailleurs, le volume spécifique de la glace étant supérieur à celui de l'eau liquide, cette transition peut endommager le cristal et diminuer son pouvoir diffractant. La congélation dans de l'azote n'étant pas possible dans une boîte à gant, du propane solide est rentré par le sas (cycles de vide

et de remplissage). Celui-ci redevient liquide dans la boîte à gant en se réchauffant, ce qui permet de plonger et congeler le cristal de manière anaérobie. Le cristal dans le propane est ensuite sorti de la boîte à gant et enfin transféré dans de l'azote, sans décongélation pour son stockage en vue d'une expérience de diffraction ultérieure sur une ligne de lumière.

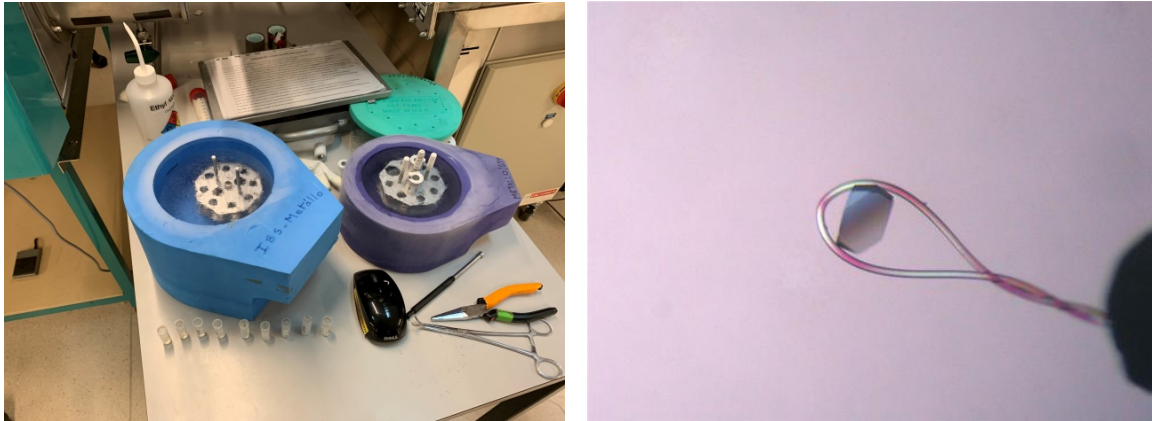


Figure 18 : Matériel pour congeler des cristaux en boîte à gant et cristal monté sur une boucle de cristallographie (Hampton®)

1.1.6 Analyse des données :

Étant donné que le synchrotron ESRF est actuellement fermé pour des travaux de remplacement de la machine pour accroître ses performances, les cristaux sont envoyés pour diffraction sur différents synchrotrons (SOLEIL, Swiss Light Source). Les clichés de diffraction sont stockés sous formes de fichiers .cbf à la sortie du détecteur. Les fichiers .cbf correspondent aux clichés de diffraction sous forme de fichier compressé pour chaque image prise par le détecteur. Ces fichiers sont ensuite lus et traités par le programme XDS via le script de Pierre Legrand (ESRF) XDSME qui va générer un fichier de réflexions intégrées et mises à l'échelle XDS_ASCII.HKL qui sera utilisé pour la suite des analyses. Le fichier généré par XDS comprend les

intensités corrigées de toutes les images .cbf avec leurs indices de Miller (H,K,L), intensité I et erreur associé Sigma(I). Le fichier HKL est ensuite convertie en fichier .mtz afin de pouvoir l'utiliser dans les différentes suites de programme actuellement disponibles pour la résolution et l'affinement des structures cristallines. Les structures ont été affinées en utilisant le programme REFINE de la suite PHENIX (34). Étant donné que la plupart de nos structures sont obtenues à partir de cristaux isomorphes, l'étape de remplacement moléculaire n'était pas nécessaire et nous avons utilisé un modèle de départ correspondant à la structure de NosL sauvage (PDB code 4R34) dans laquelle le substrat a été supprimé. Cependant, dans certains cas, la mutation ou la présence d'un ligand particulier ont induit un changement de groupe d'espace. Dans ces cas-là, nous avons dû obtenir un modèle initial par remplacement moléculaire en utilisant le programme PHASER intégré dans la suite PHENIX (34). Le modèle initial utilisé correspondant à une molécule de NosL dans laquelle les molécules d'eau et les ligands ont été supprimés. Le modèle a été corrigé manuellement en utilisant le programme COOT (35).

1.1.7 Docking moléculaire :

Le docking moléculaire a été réalisé avec la suite de programmes Schrödinger (Schrödinger Release 2018-3: Schrödinger, LCC, New York, NY, 2018). Les atomes d'hydrogènes ont été construits et les états de protonation des résidus assignés par le protocole standard de préparation de protéines de la suite Schrödinger pour la structure cristallographique de la protéine NosL native (code pdb 4R34, (27)). La position des atomes d'hydrogène construits a ensuite été optimisée. Une grille du récepteur NosL a été définie par la position du ligand L-tryptophane lié dans NosL. Les ligands L-tryptophane, 5-hydroxy-L-tryptophane et 5-nitro-D/L-tryptophane ont été

préparés en utilisant le programme Ligprep et le docking moléculaire a été effectué avec la méthode extra precision (XP) dans le programme Glide. Un docking score, permettant d'évaluer l'affinité du ligand pour le récepteur NosL, a donc été obtenu pour chaque ligand dans la protéine NosL. La procédure a été répétée en construisant le récepteur simple mutant P344G, le double mutant P344G et V366S et le triple mutant P344G, V366S et F364M.

1.2. Caractérisations fonctionnelles :

1.2.1 Résonance paramagnétique électronique :

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une méthode de spectroscopie qui permet d'étudier les matériaux et molécules possédant un ou des électrons non appariés (19). Cela est particulièrement utile pour l'étude des centres métalliques et des composés radicalaires organiques, ce qui est le cas des intermédiaires réactionnels de la réaction catalysée par NosL.

La RPE est semblable à la résonance magnétique nucléaire (RMN) dans ses principes fondamentaux. Il faut toutefois bien noter que le spin des électrons est excité en RPE, contrairement à la RMN qui s'intéresse au spin nucléaire. En effet, les électrons libres possèdent un moment magnétique et un spin. Lorsqu'on les soumet à un champ magnétique extérieur intense de l'ordre du tesla, les spins vont s'aligner de manière parallèle ou antiparallèle au champ magnétique. Chaque alignement aura une énergie spécifique lié à l'effet Zeeman. Une onde électromagnétique de fréquence fixe perpendiculaire au champ magnétique que l'on fera varier sera envoyée sur l'échantillon, ce qui permet d'obtenir un spectre d'absorption et par conséquent des informations sur le matériel électronique. La dérivée de l'absorbance est utilisée pour analyser le spectre. Sur les diagrammes, le champ magnétique est représenté en

abscisse et en ordonné la dérivée de l'absorbance comme cela peut être vu sur la figure 8 (36).

Les échantillons protéiques pour la RPE sont préparés sous atmosphère anaérobie. En condition standard, la protéine est incubée avec un excès de substrat (ou analogue), de SAM et d'agent réducteur puis congelé à un temps donné afin de piéger la réaction et observer un éventuel intermédiaire. Nous avons aussi souhaité réalisé des cinétiques suivies par RPE afin de pouvoir suivre le devenir de l'électron célibataire tout au long de la réaction. Pour cela, les protéines NosL WT et ses mutants doivent d'abord être réduits par ajout de 1mM de dithionite puis lavés afin d'éliminer le dithionite excédentaire. Cela s'effectue par des lavages et des concentrations successives (7 lavages). La concentration finale doit être autour de 8mg / mL. Le L-tryptophane est ensuite ajouté à 5 mM. Les cinétiques sont déclenchées par ajout de la SAM à 1 mM, directement dans le tube RPE. La cinétique est arrêtée aux temps souhaités en plongeant les tubes RPE dans une pièce métallique préalablement refroidis dans de l'azote liquide. Les tubes sont ensuite conservés dans de l'azote puis amenés au CEA Grenoble pour analyse.

Résultats :

Le projet de recherche est découpé en deux versants complémentaires : (i) modifier le site actif de NosL pour permettre à l'enzyme de produire des dérivés MIA plus hydrophiles et (ii) mieux comprendre le mécanisme réactionnel de l'enzyme.

La première partie du projet concerne la bioingénierie de la protéine NosL, par une approche de mutagenèse dirigée afin de permettre à l'enzyme d'accommoder des

ligands plus hydrophiles dérivant du L-tryptophane. Les possibilités de mutations sont très contraintes car les acides aminés du site actif ont, pour la plupart, un rôle précis dans le mécanisme catalytique. Notamment, il ne faut pas perturber les facteurs qui contrôlent la rotation du cycle indole lors de la migration du carbonyle. En effet, cela empêcherait une recombinaison correcte sur le carbone en position 2 de l'indole et bloquerait la production de MIA. Une meilleure compréhension de la relation structure-activité de l'enzyme NosL et de sa promiscuité pourrait permettre à terme d'améliorer la solubilité du nosiheptide et de développer cet antibiotique en clinique. Ainsi, différents ligands dérivant du L-tryptophane ont été co-cristallisés avec NosL, tout en cherchant à conserver le mécanisme de migration du carbonyle, afin d'obtenir un dérivé MIA plus hydrophile qui puisse toujours être intégré dans le nosiheptide. En particulier, la position 5 du cycle indole a été particulièrement ciblée puisqu'il a été montré que l'utilisation d'un dérivé 5-fluoro-L-tryptophane permettait de produire un dérivé du nosiheptide avec des propriétés antibiotiques accrues (37). D'autre part, du fait du mécanisme de NosL et de la nécessité d'intégration dans le nosiheptide, les substitutions ne peuvent avoir lieu que sur certaines positions. Il est uniquement possible de cibler les positions 5, 6 et 7 et pas les positions 2 et 4. Par conséquent, les dérivés possibles du L-tryptophane sont très contraints par le mécanisme réactionnel, la structure du site actif de l'enzyme et les possibilités de synthèse en chimie organique.

L'autre approche expérimentale a été développée autour de l'étude du mécanisme réactionnel de la protéine NosL et vise à mieux comprendre comment l'enzyme catalyse la transformation du L-tryptophane en MIA. Notamment, Bhandari et al ont pu mettre en évidence l'élimination d'un cyanure comme produit secondaire

de la réaction catalytique (29). Toutefois, le mécanisme d'élimination de ce cyanure n'est pas bien compris, en particulier comment la matrice protéique contrôle cette libération. Des calculs préliminaires effectués avant mon arrivée au laboratoire ont montré en effet, que la décarboxylation en position 2 est très nettement favorisée dans les conditions expérimentales connues. Il y a donc un élément inconnu ou incompris qui va permettre de renverser cette tendance au profit du départ du cyanure. C'est un des objectifs de mes travaux que d'arriver à identifier ce facteur. Par ailleurs, lors des tests *in vitro*, la protéine produit exclusivement du MI au lieu du MIA physiologique. Il a été rapporté que le changement du système de réduction est responsable de la bifurcation MI/MIA. Cependant ces résultats n'ont pas pu être reproduits, ni au laboratoire, ni chez nos collaborateurs. Il est important d'éclaircir ce point pour mieux maîtriser l'enzyme NosL et son utilisation potentielle en biologie de synthèse.

1.1 Amélioration de la solubilité du nosiheptide : co-cristallisation et mutagenèse de NosL

1.1.1 Accommodation du 5-fluoro et 6-fluoro-L-tryptophane par NosL :

Zhang et al ont pu montrer de manière fonctionnelle que les dérivés fluorés du L-tryptophane étaient bien pris en charge par l'enzyme NosL et que l'enzyme pouvait produire du 5- ou 6-fluoro-MIA (37). Nous avons obtenu des structures cristallines (voir caractéristiques de collectes et d'affinement en annexe 1) de NosL en complexe avec les 5- et 6-fluoro-L-tryptophane (figure 19), ce qui permet de visualiser de manière précise comment NosL fixe ces nouveaux substrats, et notamment caractériser les interactions moléculaires mises en jeu. La présence d'un atome de fluor en position 5 ou 6 permet normalement d'établir une liaison hydrogène supplémentaire en solution avec des molécules d'eau, en tant que receveur, ce qui améliore la solubilité de la

moitié indolique. Comme le montre la figure 19, les dérivés fluorés du L-tryptophane se fixent tous les deux de la même manière, dans la même orientation et à la même position que le L-tryptophane. En ce qui concerne le dérivé 6-fluoro-L-tryptophane, un mauvais contact avec la chaîne latérale de la valine 366 a entraîné une légère rotation de cette dernière sans affecter la fixation du ligand. Nous notons par ailleurs que les distances entre la proline 344 et les fluors en position 5 ou 6 du L-tryptophane entraînent une interaction répulsive de type van der Waals, défavorable à l'intégration d'un substituant plus encombrant à cette position. Notre objectif est de pouvoir réaliser la transformation d'un dérivé nitro du L-tryptophane en position 5. Il est donc nécessaire de modifier cette partie du site actif pour améliorer la promiscuité de l'enzyme, notamment en réalisant une mutation de cette proline en un acide aminé plus petit. Cependant il est aussi nécessaire de s'assurer que cette mutation n'affectera pas significativement l'activité de l'enzyme. Afin de tester cette approche, nous avons commencé par une étape de modélisation.

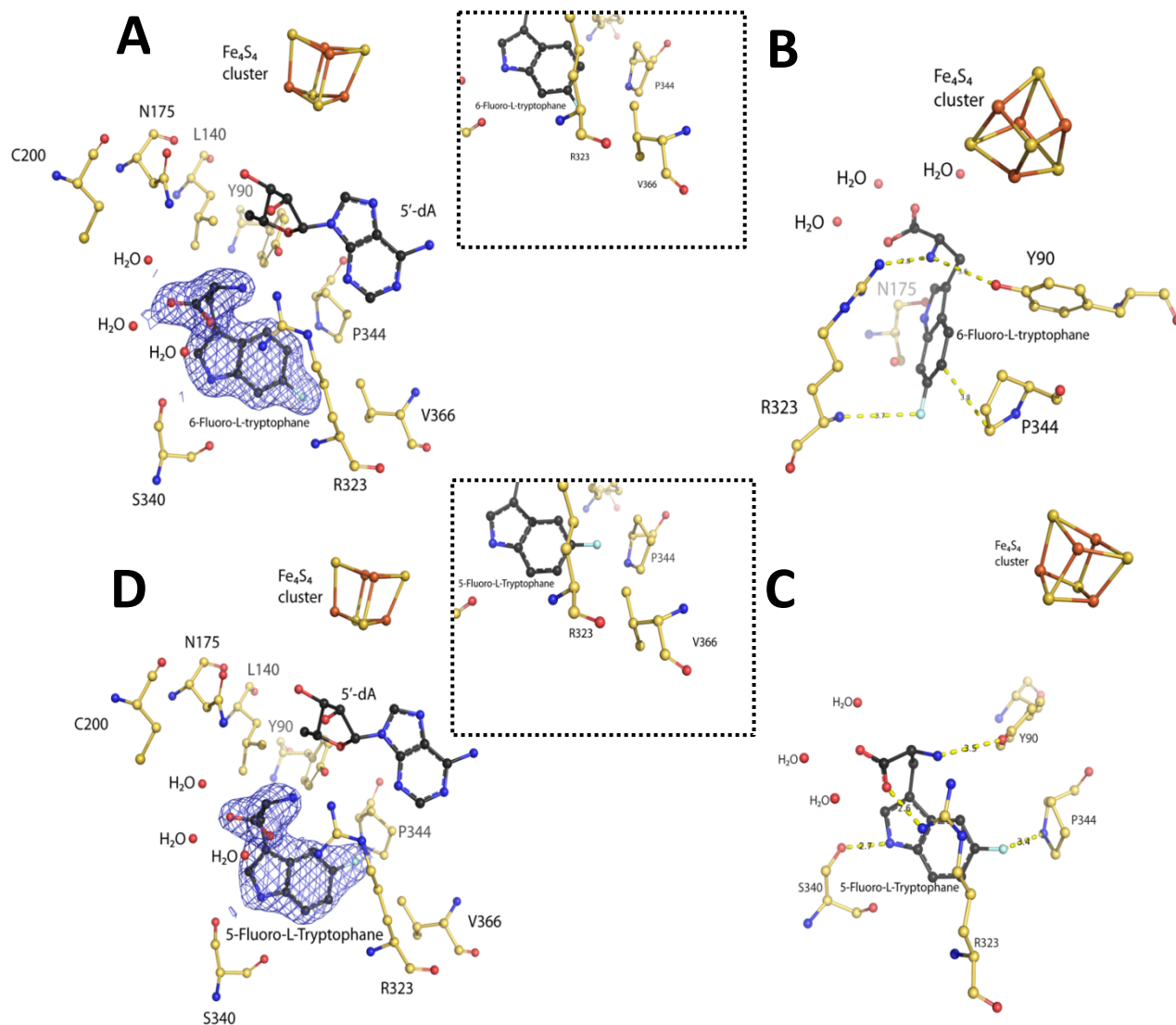


Figure 19: Co-cristallisation du 6-fluoro- L-tryptophane et du 5-fluoro-L-tryptophane avec NosL. **A** : densité électronique $2Fo-Fc$ à 1 sigma calculée autour du 6-fluoro-L-tryptophane dans le site actif de NosL et zoom sur le résidu V366. **B** : interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif Y90, N175, R323 et P344. **C** : densité électronique $2Fo-Fc$ à 1 sigma calculée autour du 5-fluoro-L-tryptophane avec le site actif de NosL et zoom sur le résidu V366. **D** interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif S340, R323, P344 et Y90.

1.2.1 Modélisation de mutations et de fixation de substrats dans le site actif de NosL

L'accostage moléculaire (molecular docking) permet de prédire la fixation d'un ligand dans un site actif, en présence d'éventuelles mutations. Ainsi, une première modélisation du 5-nitro-L-tryptophane dans le site actif de NosL a été réalisée.

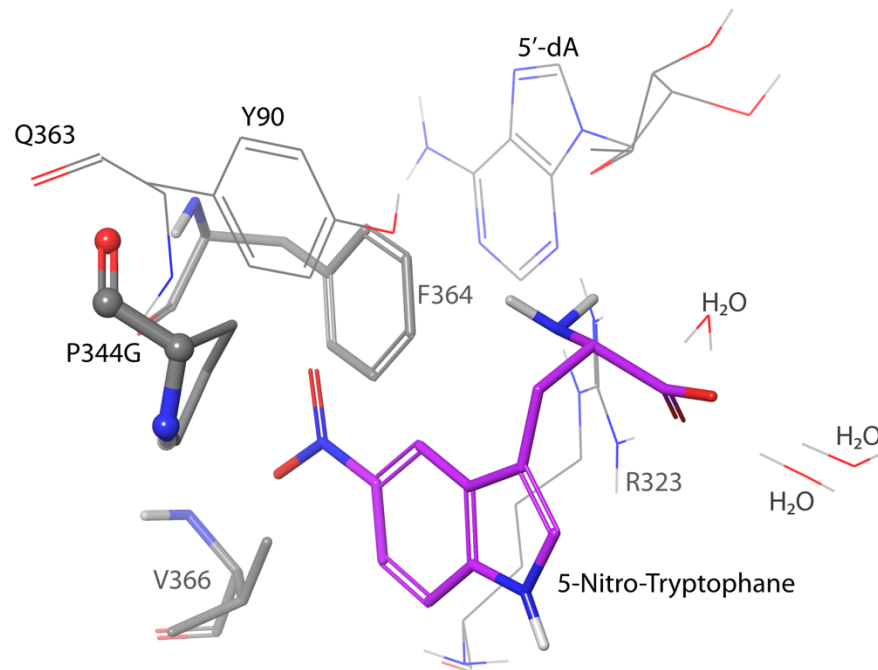


Figure 20 : Modélisation du 5-nitro-tryptophane (en violet) dans l'enzyme native NosL. Les résidus clés de l'enzyme native. Y90, Q363 et R323 sont représentés en batons. Les résidus considérés pour une mutation F364 et V366 sont représentés en batons gras.

Comme nous pouvons nous y attendre, dans l'enzyme sauvage, le mode de fixation prédit du 5-nitro-L-tryptophane est très différent de celui du L-tryptophane et est donc incompatible avec une transformation en dérivé du MIA. Ceci est dû aux mauvais contacts que le ligand établit avec la protéine. En effet, si on modélise le 5-nitro-L-tryptophane dans la même orientation et position que le L-tryptophane dans la protéine sauvage ((code PDB 4R34, (27)) figure 20) nous observons que les atomes d'oxygène

du groupement nitro sont trop proches de la proline 344. En effet, la distance avec le C β de la proline est mesurée à 1.74 Å tandis que la distance avec le C δ de la proline est mesurée à 2.16 Å, indiquant des gênes stériques incompatibles avec un mode de fixation dit « productif ». Par contre, les distances avec le C α de la proline sont de 2.82 Å et 3.09 Å. Ces distances sont acceptables. Il est donc nécessaire de remplacer la proline 344 par une glycine, seul acide aminé n'ayant pas d'atome C β . La modélisation du mutant P344G de l'enzyme montre elle une bonne fixation du 5-nitro-L-tryptophane dans le site actif, avec un score de docking à -11.384, ce qui est similaire au score de docking du L-tryptophane (-10.750). Ainsi, cette mutation P344G semble libérer de la place dans le site actif et permettre l'accommodation du 5-nitro-tryptophane. Nous avons donc remplacé la proline par une glycine par mutagenèse dirigée, puis purifié le variant P344G. Des cristaux du mutant co-cristallisé avec du 5-nitro-tryptophane ont été obtenus et sont en attente d'analyse par diffraction rayon X. De même des analyses fonctionnelles sont en cours chez notre collaborateur à Paris. En revanche, les scores entre le L-tryptophane et le 5-nitro-L-tryptophane suggèrent une affinité comparable. Il semble important de poursuivre la modification du site actif afin d'être plus discriminant en faveur du 5-nitro-L-tryptophane. En effet, si l'objectif est de produire des variants de nosiheptide par biologie de synthèse, il faut que le variant de NosL soit discriminant vis-à-vis du L-tryptophane endogène.

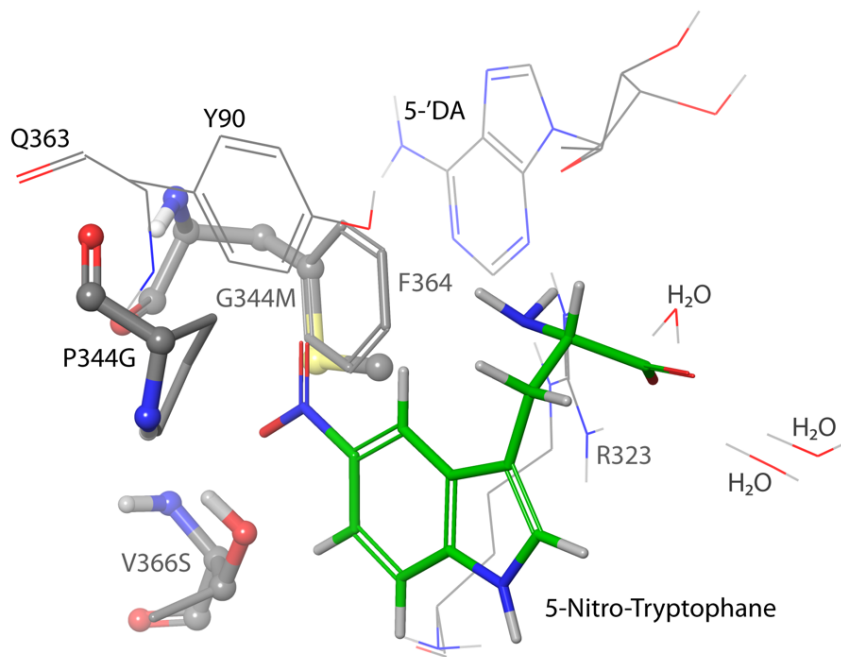


Figure 21 : Accostage moléculaire du 5-nitro-L-tryptophane (en vert) dans l'enzyme mutante NosL P344G. Les résidus clés de l'enzyme native Y90, Q363 et R323 sont représentés en batons. Les résidus considérés pour une mutation F364 et V366 sont représentés en batons gras. Le résidu P344 muté en glycine est représenté en batons et boules en gras.

Des mutations supplémentaires de la valine 366 et de la phénylalanine 364 ont été envisagées. En première approche, nous avons produit, outre le mutant P344G, un triple mutant P344G, V366S et F364M. La polarité de la cavité peut être modifiée en remplaçant la valine 366 par une sérine, acide aminé en interaction avec le groupement 5-nitro. D'autre part, la mutation de la phénylalanine 364 en méthionine pourrait permettre d'augmenter la taille de la cavité. Lorsque nous modifions ces différents acides aminés, nous remarquons, toujours par modélisation par docking moléculaire que le L-tryptophane glisse plus profondément dans la cavité pour combler l'espace libéré par les mutations et que son affinité serait abaissée comme le suggère le score de docking à -9.566 (figure 21). Ce changement affectera potentiellement l'activité car la réaction catalysée par NosL est très contrôlée (38). En revanche, les

mutations n'affectent pas le docking du 5-nitro-L-tryptophane qui garde un bon score (-10.493) et un mode de fixation identique au L-tryptophane dans la protéine sauvage. Une autre modélisation de la double mutation P344G V366S semble aussi indiquer une bonne fixation/discrimination avec un bon score de docking pour le 5-nitro-L-tryptophane et suggère que celles-ci seraient suffisante pour obtenir une enzyme spécifique toujours fonctionnelle.

1.3.1 Stratégie de modification du site actif : mutant P344G

Le mutant P344G de NosL a pu être cristallisé en présence de L-tryptophane (voir le tableau des données de collecte et d'affinement en annexe 1) et sa structure cristalline a été résolue. Des cristaux ont également pu être obtenus en présence de 5-fluoro-L-tryptophane et de 5-nitro-D/L-tryptophane. Ils ont été congelés en attendant les prochaines collectes de données au synchrotron à la fin du mois.

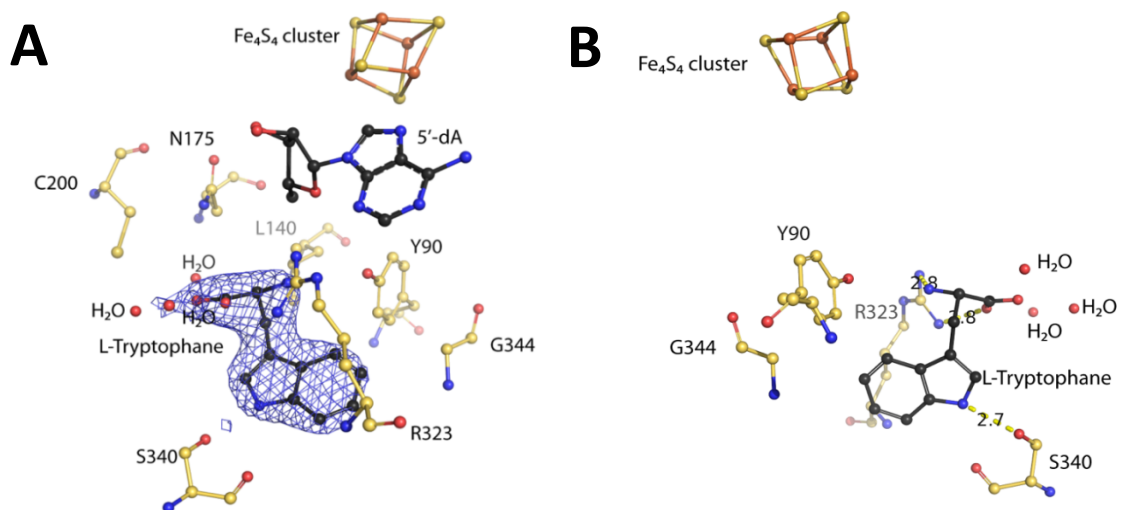


Figure 22 : Co-cristallisation du L-Tryptophane avec NosL P344G. **A** : densité électronique $2Fo-Fc$ à 1 sigma calculée autour L-tryptophane dans le site actif de NosL. **B** : interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif Y90, N175, R323 et P344.

Le mutant NosL P344G peut toujours accommoder le L-tryptophane et nous voyons que de la place a pu être libérée dans la zone autour de la position 5 du L-tryptophane (figure 20). L'espace libéré dans le site actif peut ainsi permettre à l'enzyme d'accueillir des substituants plus encombrants. Nous ne voyons pas de différence notable dans la conformation globale de l'enzyme. Comme prévu par la modélisation, le mode de fixation du L-tryptophane n'est pas affecté par cette simple mutation. Les analyses fonctionnelles *in-vitro* sont en cours. Cependant, l'analyse par spectroscopie RPE montre que le mutant P344G est toujours actif sur le L-tryptophane puisqu'il produit le même signal correspondant à l'intermédiaire de réaction préalablement caractérisé par Sicoli et al. Les analyses avec le dérivé nitro sont aussi en cours.

Le triple mutant a été produit et purifié. Il est nettement plus instable que le simple mutant et les rendements ont été très faibles. Nous sommes en train d'améliorer les protocoles de purification afin de pouvoir réaliser les analyses fonctionnelles, spectroscopiques et de cristallographie.

2.1 Etude du mécanisme réactionnel de l'enzyme :

2.1.1 Rôle de la tyrosine 90 : mutant Y90F

Lors de l'analyse de la structure cristalline de NosL obtenue en présence de son substrat (référence Nicolet 2014), il a été observé que le site actif est composé majoritairement de résidus d'acides aminés hydrophobes ou aromatiques non réactifs et ne pouvant donc pas jouer de rôle actif dans le mécanisme réactionnel. Cependant, quatre acides aminés ont été identifiés comme potentiels acteurs de la réaction. Il s'agit de l'arginine R323, la tyrosine Y90, la sérine S340 et la cystéine C200. Les trois premiers sont en interaction directe avec le L-tryptophane. La

présence d'une cystéine à proximité d'un site de réaction radicalaire est rarement anodine, étant donnée la relative stabilité des radicaux thiyls, souvent observés en biologie. Cependant, des analyses par mutagenèse dirigée ont montré, que seule R323 joue un rôle important dans la conduite de la réaction radicalaire (Bhandari 2014 Biochemistry). Pourtant, des analyses plus fines au laboratoire ont montré que les mutations remplaçant la tyrosine en phénylalanine (Y90F) ou la cystéine en sérine (C200S) présentent des particularités par rapport à la protéine sauvage qui peuvent nous renseigner sur le mécanisme de l'enzyme. Nous avons décidé d'étudier plus en détails ces deux mutants.

Le mutant Y90F semble pouvoir apporter une réponse sur la relation structure-activité de l'enzyme. En effet, le rapport MI/MIA in vitro a été décrit comme dépendant uniquement de la nature de l'agent réducteur. Cependant, ces résultats n'ont pas pu être reproduits au laboratoire, ni par nos collègues à Paris. Par contre, lors de tests préliminaires au laboratoire, il a été montré que l'enzyme sauvage est capable de recycler son électron à la fin de la réaction pour initier un nouveau cycle. Cette propriété est abolie par la mutation Y90F. Ainsi, l'étude des propriétés de ce mutant pourraient nous renseigner sur les étapes tardives du cycle catalytique.

2.1.1 Co-cristallisation de nosL Y90F avec l'acide 2-carboxylique-1H-indole :

Le mutant Y90F où la tyrosine 90 a été remplacée par une phénylalanine a pu être co-cristallisé en présence de l'acide 2-carboxylique-1H-indole, mimant l'intermédiaire préalablement caractérisé par RPE dans le site actif, la seule différence provenant de l'absence du fragment iminoethyl en position 2. La structure cristalline a pu être résolue (voir tableau de l'annexe 1).

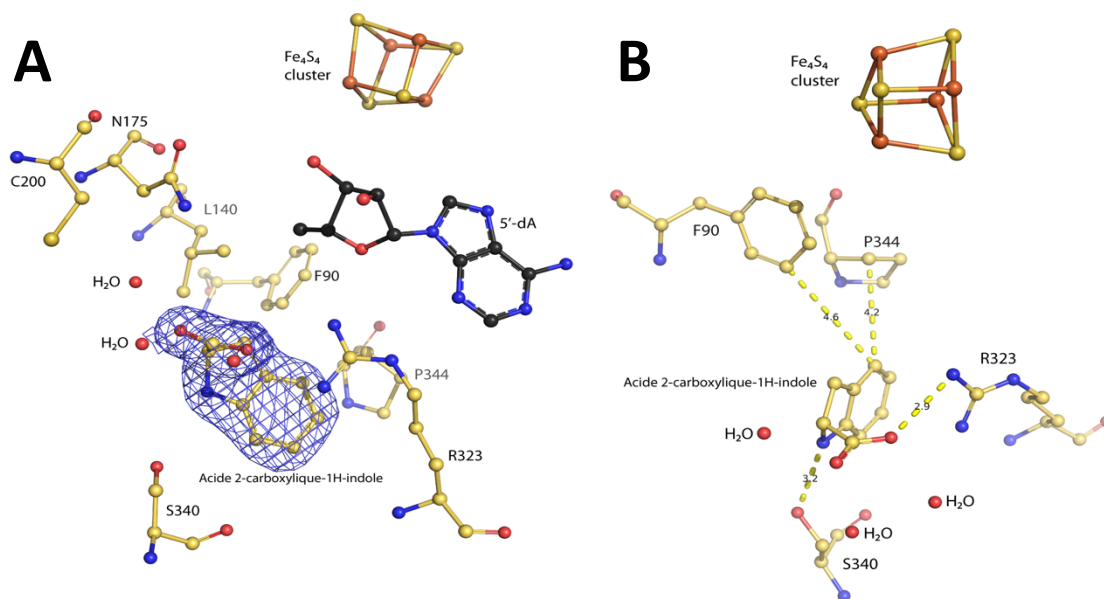


Figure 23 : Co-cristallisation de l'acide 2-carboxylique-1H-indole avec le mutant de NosL Y90F. **A** : densité électronique $2F_o-F_c$ à 1 sigma calculée autour l'acide 2-carboxylique-1H-2,3-dihydroindole dans le site actif de NosL. **B** : interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif Y90, N175, R323 et P344.

La suppression du groupement hydroxyle de la tyrosine a permis de montrer que celle-ci n'était pas nécessaire à l'interaction avec l'analogue d'intermédiaire réactionnel. En effet, nous n'avons noté aucune différence dans la conformation du ligand suite à la mutation par rapport à la structure native préalablement publiée (code PDB et référence). Par ailleurs, mis à part une légère réorientation du cycle benzyle, aucun changement structural significatif n'est observé dans le site actif.

2.1.2 Co-cristallisation de nosL Y90F avec le L-Tryptophane :

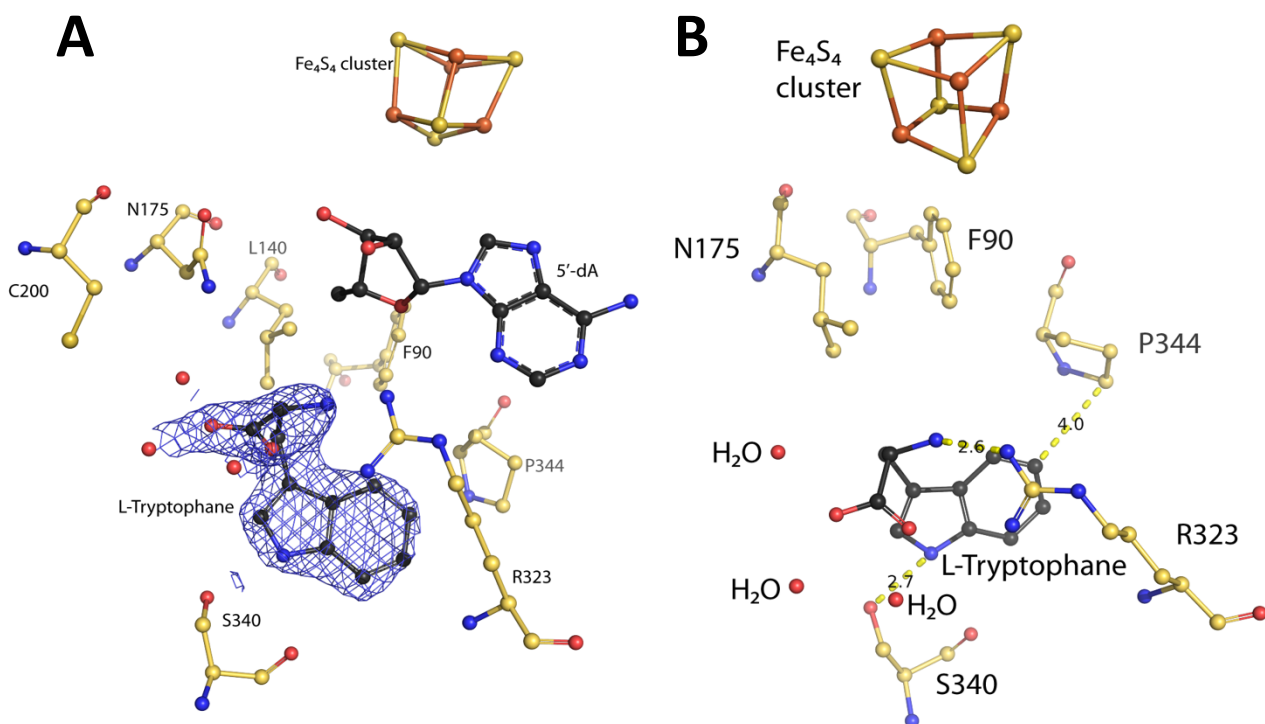


Figure 24 : Co-cristallisation du L-tryptophane avec le mutant de nosL Y90F. **A** : densité électronique $2Fo-Fc$ à 1 sigma calculée autour L-tryptophane dans le site actif de NosL. **B** : interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif Y90, N175, R323 et P344.

Le mutant Y90F a également pu être co-cristallisé en présence de L-tryptophane (figure 24). Sa conformation globale dans le site actif ne montre pas de modification, ce qui réfute la présence d'une liaison hydrogène importante entre le groupement phénol de la tyrosine et l'amine du L-tryptophane.

Ainsi, la mutation n'affecte ni la structure du site actif, ni la fixation du substrat ou de l'intermédiaire. Des résultats antérieurs de RPE avaient montré qu'effectivement le même signal est observé. L'effet de la mutation est donc ailleurs, probablement dans la capacité de cette tyrosine à servir de relai entre un intermédiaire à caractériser et le centre FeS pour permettre le transit de l'électron. Afin de creuser cette piste, nous

avons entrepris une analyse poussée par spectroscopie RPE pour mieux suivre et comprendre l'effet de la mutation sur les échanges électroniques au sein de l'enzyme. (voir plus bas)

2.2.1 Rôle de la cystéine 200 : mutant C200S

Le mutant C200S correspond à la mutation de la cystéine 200 en sérine. Il a été observé au laboratoire l'apparition d'un signal radicalaire supplémentaire ayant pour origine un radical sur un résidu de la protéine.

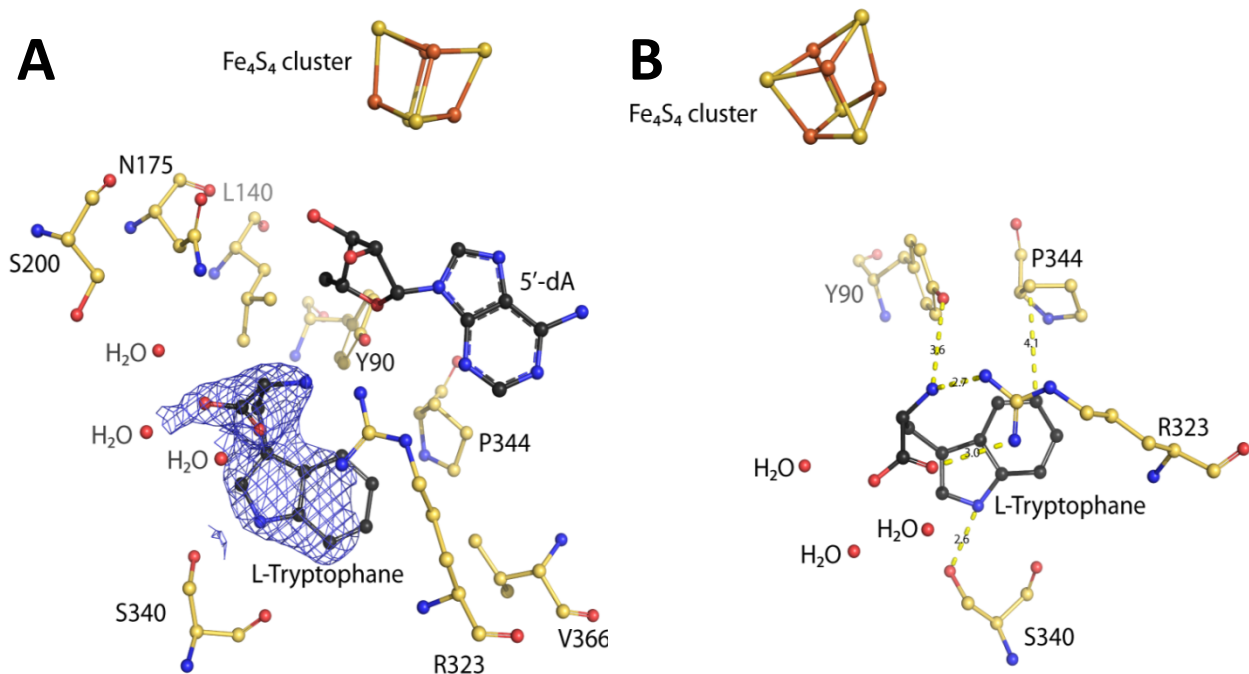


Figure 25 : Co-cristallisation du L-tryptophane avec le mutant de nosL C200S. A : densité électronique 2Fo-Fc à 1 sigma calculée autour L-tryptophane dans le site actif de NosL. B : interactions du ligand avec certains résidus clé du site actif Y90, N175, R323 et P344.

Nous avons résolu la structure cristalline du mutant C200S en complexe avec son substrat le L-tryptophane. Cette cystéine est éloignée du substrat et sa mutation n'affecte pas la réactivité de l'enzyme in vitro (26). La mutation C200S ne semble

pas avoir d'effets structural : la superposition avec l'enzyme native ne montre pas de différence de positions pour le site actif ou le ligand. La figure 25 montre simplement une baisse du taux d'occupation du L-tryptophane, probablement lié à une trop faible concentration de ligand lors de la production des cristaux.

2.3.1 Suivi de la réaction enzymatique par spectroscopie RPE

Nous avons, afin de pouvoir suivre les espèces radicalaires, réalisé une série de cinétiques suivies par spectroscopie RPE. Nous avons commencé par la protéine sauvage, afin d'avoir une référence des évènements. La réaction *in vitro* est très lente, ce qui est assez classique avec les protéines à radical SAM. La réaction commence avec la protéine préalablement réduite. Il est possible en modifiant les conditions expérimentales de mesure et en jouant sur les différents de temps de relaxation, de ségréger les signaux provenant du centre 4Fe-4S réduit, de ceux provenant de radicaux organiques.

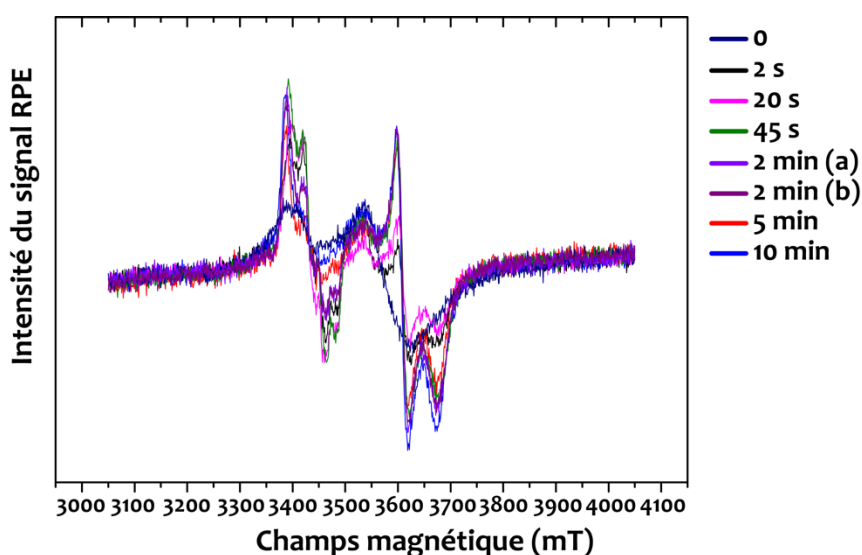


Figure 26 : suivi de la cinétique d'activation de NosL par résonance paramagnétique électronique à onde continue. Les échantillons correspondants au temps 0, 2s, 20s, 45s, 2min, 5 min et 10 min et permettent de vérifier la réduction du cluster fer-soufre.

Ainsi, les premiers spectres montrent le centre FeS réduit, ainsi que la modification du spectre due à la fixation progressive de la SAM, suivie de l'apparition du radical organique préalablement décrit au détriment du signal sur le centre FeS et enfin une réapparition du signal résultant de la re-réduction du cluster. La même cinétique a été réalisée avec le mutant Y90F pour lequel nous ne devrions pas voir apparaître la re-réduction du centre FeS. Les échantillons sont en attente d'analyse au moment de la rédaction de ce manuscrit.

Discussion

1.1 Changement d'activité :

1.1.1 Mutant P344G :

La caractérisation du mutant P344G n'est pas encore complètement achevée : une analyse de type LC-MS des produits de réaction est en cours chez nos collaborateurs à Paris. Elle confirmera la production ou non de dérivé nitro du MIA. Il en est de même pour l'analyse structurale. Autant le L-tryptophane ne voit pas son mode de fixation affecté, comme prédit par nos modélisations, autant l'analyse des cristaux contenant le dérivé nitro pourra montrer si oui ou non, ce composé se fixe tel que prédit par nos modélisations. Quoi qu'il en soit, en vue d'une approche par mutagenèse aléatoire, ce mutant peut se révéler être un bon point de départ pour faire évoluer NosL vers une enzyme spécifique du 5-nitro-L-tryptophane pour une utilisation en biologie de synthèse. Ces travaux seront poursuivis par la production d'autres mutants plus spécifiques, notamment le triple mutant sur lequel nous avons commencé à travailler, mais aussi d'autres en cours d'élaboration.

1.1.2 Biologie de synthèse :

La modification du site actif de NosL pour produire du MIA peut, de manière fortuite, mener à la biosynthèse de composés dérivants du L-tryptophane e. En modifiant également les autres protéines de l'opéron NOS, nous pouvons imaginer produire des peptides variés avec de potentielles approches thérapeutiques pour d'autres pathologies (39). Cela peut être généralisable à d'autres enzymes, pas nécessairement de la famille des protéines à radical SAM.

1.2. Mécanisme de l'enzyme

Le mécanisme de l'enzyme NosL pour transformer le L-tryptophane en MIA n'est pas encore totalement élucidé. Notamment, nous ne sommes toujours pas en mesure de comprendre comment le cyanure est éliminé.

1.2.1 Enzyme native :

Une cinétique *in crystallo* est en cours d'analyse afin de mieux comprendre les étapes catalysées par NosL et espérer piéger des intermédiaires réactionnels qui permettront à terme d'avoir plus d'informations sur le mécanisme enzymatique.

Notamment, nous aimerions savoir comment le cyanure est éliminé dans la réaction et quelles interactions sont mises en jeu par les acides aminés environnant. Jusqu'à maintenant, il n'a pas été possible de piéger ce produit de réaction mais différentes expériences sont en cours, notamment en co-cristallisant l'enzyme avec du cyanure et via la cinétique enzymatique. La difficulté réside également dans l'impossibilité jusqu'à présent de co-cristalliser l'enzyme avec le MIA, car il s'agit du produit final de la réaction et que celui-ci posséderait une affinité moindre pour le site actif.

1.2.2 Mutants pour comprendre le mécanisme catalytique :

L'approche par mutagenèse dirigée combinée à la RPE et l'analyse fonctionnelle est une approche puissante pour mieux comprendre le rôle de chaque acide aminé de manière expérimentale. En effet, en mutant les acides aminés comme pour C200S et Y90F il est possible de mettre en évidence que ceux-ci ont un rôle précis dans le mécanisme de l'enzyme, même si cela n'est pas intuitif au premier abord. Bhandari et al avaient commencés un premier travail (26) pour comprendre de manière globale leur rôle respectif. Il est ainsi nécessaire de poursuivre cette approche sur de nouveaux résidus pour répondre aux questions mécanistiques.

1.2.3 Approche par alanine scanning :

Un autre type d'approche envisagée fait appel à une mutagenèse systématique de chaque acide aminé du site actif en alanine dans un rayon de quelques angströms autour du site actif. Un premier test d'activité permettrait de sélectionner les mutants les plus intéressants, en analysant par LC/MS les produits de réaction. Une combinaison avec des données structurales et de RPE pour les mutants les plus prometteurs pourraient à terme compléter la relation structure activité de NosL.

THÈSE SOUTENUE PAR : Mathias EYMERY

TITRE :

CRISTALLOGRAPHIE APPLIQUÉE A LA RECHERCHE D'INHIBITEURS ET ÉTUDE DE MÉCANISMES RÉACTIONNELS AUTOUR DE LA BIOSYNTHÈSE D'ANTIBIOTIQUES

CONCLUSION :

La recherche de nouvelles thérapeutiques est une préoccupation constante de l'Homme depuis la nuit des temps. Les méthodes les plus courantes sont basées sur la sérendipité, avec la découverte fortuite de l'action d'une plante ou d'un composé sur une pathologie donnée. Depuis quelques décennies, il est possible de caractériser des protéines impliquées dans des pathologies et de dessiner *in silico* de potentiel inhibiteur : il s'agit de la conception rationnelle de médicaments dite basée sur la structure, généralement obtenue par cristallographie des protéines. Les différentes étapes de la production de la protéine jusqu'à sa cristallisation, diffraction et recherche *in silico* d'inhibiteurs ont ainsi pu être décrites au cours de cette thèse d'exercice.

Dans un second temps, un exemple concret de recherche pharmaceutique a pu être développé, s'intéressant à l'antibiotique nosiheptide et la synthèse de sa moitié indolique par la protéine NosL, à partir du L-Tryptophane. Il a ainsi été possible de co-cristalliser l'enzyme native avec des dérivés 5- et 6-fluorés du L-tryptophane puis de réaliser un mutant P344G afin de libérer de la place dans le site actif. Les premières structures obtenues avec ce mutant semblent indiquer une promiscuité accrue pour cette enzyme, avec notamment la possibilité à terme de lui faire prendre en charge des substituants plus importants, comme par exemple des dérivés du L-tryptophane avec un groupe fonctionnel nitro (-NO₂) pour lesquelles des cristaux ont été obtenus et dont la caractérisation est en cours.

Par ailleurs, des mutants Y90F et C200S ont également été réalisés afin de comprendre le rôle de ces résidus dans le mécanisme catalytique. Il a pu être mis en évidence que Y90F jouait un rôle dans la réaction, puisque le nombre de réactions de l'enzyme est limité à une seule lorsque l'enzyme est préalablement réduite par un seul équivalent réducteur. Ceci n'est pas le cas pour l'enzyme native qui semble avoir la capacité de recycler l'électron célibataire à la fin de chaque cycle réactionnel. Le mutant C200S possède également un intérêt du fait de la détection d'un nouveau signal en résonance paramagnétique électronique dû à une nouvelle espèce radicalaire lors de la mutation de la cystéine en sérine. Une caractérisation fonctionnelle reste nécessaire pour comprendre les modifications du mécanisme catalytique engendré par la réaction. Des expériences de cinétique *in crystallo* et de RPE sont également

en cours d'analyse afin de comprendre de manière fine le mécanisme de chimie radicalaire dans ses différentes étapes.

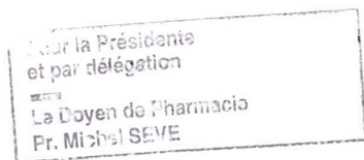
VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le : 17 10S /2019

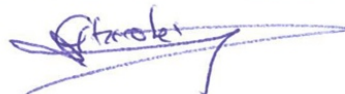
LE DOYEN



Michel SEVE



LE DIRECTEUR DE THESE :



LE TUTEUR UNIVERSITAIRE :



Bibliographie :

1. Hook JB, Poste G, éditeurs. Protein Design and the Development of New Therapeutics and Vaccines. Springer US; 1990. (New Horizons in Therapeutics).
2. Histoire [Internet]. [cité 22 avr 2019]. Disponible sur: <https://www.afc.asso.fr/qu-est-ce-que-la-cristallographie/histoire>
3. Blundell TL, Jhoti H, Abell C. HIGH-THROUGHPUT CRYSTALLOGRAPHY FOR LEAD DISCOVERY IN DRUG DESIGN. Nature Reviews Drug Discovery. 2002;1(1):45-54.
4. David Blow. Outline of Crystallography for Biologists. Oxford: Oxford University Press; 2002.
5. Phillips DC. The Hen Egg-White Lysozyme Molecule. PNAS. 1967;57(3):483-95.
6. European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) [Internet]. [cité 21 mars 2017]. Disponible sur: <http://www.esrf.eu/>
7. RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB [Internet]. [cité 20 mai 2019]. Disponible sur: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
8. Novalix pharma [Internet]. [cité 29 avr 2019]. Disponible sur: <https://www.novalix.com/>
9. Astex – Oncology and CNS Drug Discovery & Development [Internet]. [cité 25 avr 2019]. Disponible sur: <https://astx.com/>
10. Proteros Home [Internet]. [cité 25 avr 2019]. Disponible sur: <http://www.proteros.com/>
11. Schindler T. Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. Science. 2000;289(5486):1938-42.
12. Brandstetter H, Turk D, Hoeffken HW, Grosse D, Stürzebecher J, Martin PD, et al. Refined 2·3ÅX-ray crystal structure of bovine thrombin complexes formed with the benzamidine and arginine-based thrombin inhibitors NAPAP, 4-TAPAP and MQPA. Journal of Molecular Biology. 1992;226(4):1085-99.
13. van Ryn J, Goss A, Huel N, Wienen W, Priepke H, Nar H, et al. The Discovery of Dabigatran Etexilate. Frontiers in Pharmacology [Internet]. 2013 [cité 25 avr 2019];4. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2013.00012/abstract>

14. Wiene W, Stassen J-M, Pripke H, Ries UJ, Huel N. Effects of the direct thrombin inhibitor dabigatran and its orally active prodrug, dabigatran etexilate, on thrombus formation and bleeding time in rats. *Thromb Haemost.* 2007;98(2):333-8.
15. Kimber MC, Moody CJ. Construction of macrocyclic thiopeptides: synthesis of a nosiheptide 'southern hemisphere' model system. *Chem Commun.* 2008;(5):591-3.
16. Haste NM, Thienphrapa W, Tran DN, Loesgen S, Sun P, Nam S-J, et al. Activity of the thiopeptide antibiotic nosiheptide against contemporary strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antibiotics.* 2012;65(12):593-8.
17. Just-Baringo X, Albericio F, Álvarez M. Thiopeptide Antibiotics: Retrospective and Recent Advances. *Marine Drugs.* 2014;12(1):317-51.
18. Jin L, Wu X, Xue Y, Jin Y, Wang S, Chen Y. Mutagenesis of NosM Leader Peptide Reveals Important Elements in Nosiheptide Biosynthesis. Kivisaar M, éditeur. *Applied and Environmental Microbiology.* 2017;83(4).
19. LaMattina JW, Wang B, Badding ED, Gadsby LK, Grove TL, Booker SJ. NosN, a Radical S -Adenosylmethionine Methylase, Catalyzes Both C1 Transfer and Formation of the Ester Linkage of the Side-Ring System during the Biosynthesis of Nosiheptide. *Journal of the American Chemical Society.* 2017;139(48):17438-45.
20. Badding ED, Grove TL, Gadsby LK, LaMattina JW, Boal AK, Booker SJ. Rerouting the Pathway for the Biosynthesis of the Side Ring System of Nosiheptide: The Roles of NosI, NosJ, and NosK. *Journal of the American Chemical Society.* 2017;139(16):5896-905.
21. Yu Y, Duan L, Zhang Q, Liao R, Ding Y, Pan H, et al. Nosiheptide Biosynthesis Featuring a Unique Indole Side Ring Formation on the Characteristic Thiopeptide Framework. *ACS Chem Biol.* 2009;4(10):855-64.
22. Thiopeptide Antibiotic Database [Internet]. [cité 11 nov 2018]. Disponible sur: http://db-mml.sjtu.edu.cn/THIOBASE/cluster.php?cluster_id=101
23. Qiu Y, Du Y, Zhang F, Liao R, Zhou S, Peng C, et al. Thiolation Protein-Based Transfer of Indolyl to a Ribosomally Synthesized Polythiazolyl Peptide Intermediate during the Biosynthesis of the Side-Ring System of Nosiheptide. *Journal of the American Chemical Society.* 2017;139(50):18186-9.
24. Frey PA, Hegeman AD, Ruzicka FJ. The Radical SAM Superfamily. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2008;43(1):63-88.

25. Fenwick MK, Mehta AP, Zhang Y, Abdelwahed SH, Begley TP, Ealick SE. Non-canonical active site architecture of the radical SAM thiamin pyrimidine synthase. *Nature Communications* [Internet]. déc 2015 [cité 28 oct 2018];6(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ncomms7480>
26. Bhandari DM, Xu H, Nicolet Y, Fontecilla-Camps JC, Begley TP. Tryptophan Lyase (NosL): Mechanistic Insights from Substrate Analogues and Mutagenesis. *Biochemistry*. 2015;54(31):4767-9.
27. Nicolet Y, Zeppieri L, Amara P, Fontecilla-Camps JC. Crystal Structure of Tryptophan Lyase (NosL): Evidence for Radical Formation at the Amino Group of Tryptophan. *Angewandte Chemie*. 2014;126(44):12034-8.
28. Sicoli G, Mouesca J-M, Zeppieri L, Amara P, Martin L, Barra A-L, et al. Fine-tuning of a radical-based reaction by radical S-adenosyl-L-methionine tryptophan lyase. *Science*. 2016;351(6279):1320-3.
29. Bhandari DM, Fedoseyenko D, Begley TP. Mechanistic Studies on Tryptophan Lyase (NosL): Identification of Cyanide as a Reaction Product. *Journal of the American Chemical Society*. 2018;140(2):542-5.
30. 1 Introduction to protein crystallisation [Internet]. [cité 26 janv 2019]. Disponible sur: http://www.xray.bioc.cam.ac.uk/xray_resources/whitepapers/xtal-in-action/node3.html
31. La Loi de Bragg [Au Cœur des Matériaux Cristallins] [Internet]. [cité 23 mars 2019]. Disponible sur: <http://nte.mines-albi.fr/SciMat/co/SM2uc7-2.html>
32. Ungar G, Chen ZH, Zeng X. X-ray scattering. In: *Series in Soft Condensed Matter* [Internet]. WORLD SCIENTIFIC; 2016 [cité 25 avr 2019]. p. 209-53. Disponible sur: http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/9789814619264_0006
33. Hampton Research [Internet]. [cité 25 mars 2019]. Disponible sur: https://hamptonresearch.com/product_image_full_size.aspx?id=385&inset=2
34. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. *PHENIX*: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 2010;66(2):213-21.
35. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of *Coot*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. 2010;66(4):486-501.
36. Monteil C. Résonance paramagnétique électronique (RPE). :54.

37. Zhang Q, Li Y, Chen D, Yu Y, Duan L, Shen B, et al. Radical-mediated enzymatic carbon chain fragmentation-recombination. *Nature Chemical Biology*. 2011;7(3):154-60.
38. Amara P, Mouesca J-M, Bella M, Martin L, Saragaglia C, Gambarelli S, et al. Radical SAM tryptophan lyase (NosL): how the protein controls the carboxyl radical •CO₂- migration. *Journal of the American Chemical Society* [Internet]. 12 nov 2018 [cité 15 nov 2018]; Disponible sur: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.8b09142>
39. Koutsopoulos S. *Peptide Applications in Biomedicine, Biotechnology and Bioengineering*. Woodhead Publishing; 2017. 655 p.

Annexes:

Jeu de données	NosL WT – 5Fluoro- tryptophane	NosL WT – 6Fluoro- tryptophane	NosL Y90F - Indoline	NosL Y90F – L-tryptophane
Référence	MEA03	MEA08	MEA14	MEA18
Collection des données				
Ligne de lumière	SOLEIL – PROXIMA-1	SOLEIL – PROXIMA-2	SOLEIL – PROXIMA-2	SOLEIL – PROXIMA-2
Groupe d'espace	P 1 2 1	P 1 2 1	P 1 2 1	P 1 2 1
a b c (Å)	94.27 46.94 113.99	47.217 94.295 113.891	93.74 47.01 113.79	94.60 46.91 113.96
$\alpha \beta \gamma$ (°)	90.000 108.839 90.000	71.254 89.949 89.902	90.000 108.469 90.000	90.000 109.023 90.000
Longueur d'onde (Å)	0.980120	1.033202	0.980120	1.033202
Résolution (Å) ^a	1.9	1.700	1.821	1.800
I/ σ (I)	10.53 (0,84)	13.60 (1.30)	11.32 (1.04)	14.71 (1.16)
CC _{1/2} (%)	99,8 (50,3)	99.9 (72.1)	99.8 (69.4)	99.9 (69.6)
Complétude (%)	99.3(97)	99.7% (98.8%)	99.5 (97.6)	99.7 (99.0)
Redondance	6,78 (6,8)	6.77 (6,80)	6.61 (5,84)	6,1 (6,1)
Affinement				
Nombre de réflexions	75108	105136	88073	
R _{work} /R _{free}	0.1679/ 0.2065	0.1531/ 0.1724	0.1621/0.1959	0.1590/ 0.1894
<i>Nombre d'atomes</i>				
Protéine	6222	6050	5930	5995
<i><Facteur-B> (Å²)</i>				
Protéine	44.35	40.38	39.76	45,94
<i>r.m.s déviations</i>				
Longueur des liaisons (Å)	0.009	0.009	0.018	0.015
Angle des liaisons (°)	1.012	0.980	1.437	1.255

Jeu de données	NosL P344G – L- tryptophane	NosL C200S – L- tryptophane
Référence	ME23	MEA25
Collection des données		
Ligne de lumière	SOLEIL – PROXIMA-1	SOLEIL – PROXIMA-1
Groupe d'espace	P 1 2 1	P 1 2 1
a b c (Å)	94.24 46.69 113.53	94.74 46.89 114.17
$\alpha \beta \gamma$ (°)	90.000 109.383 90.000	90.000 108.959 90.000
Longueur d'onde (Å)	0.978566	0.978566
Résolution (Å) ^a	1.780	1.750
I/ σ (I)	14.32 (1.19)	12.19 (1.08)
CC _{1/2} (%)	99.9 (84.1)	99.9 (72.4)
Complétude (%)	99.6 (98.4)	99.1 (95.1)
Redondance	6.86 (6.61)	6.01 (5.98)
Affinement		
Nombre de réflexions	90417	187242
R _{work} /R _{free}	0.1672 / 0.1929	0.1696 / 0.1964
<i>Nombre d'atomes</i>		
Protéine	6005	6048
<i><Facteur-B>(Å²)</i>		
Protéine	53,25	45.10
r.m.s déviations		
Longueur des liaisons (Å)	0.009	0.007
Angle des liaisons (°)	1.036	0.897

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des données de cristallographie



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Mathias EYMERY

CRISTALLOGRAPHIE APPLIQUÉE A LA RECHERCHE D'INHIBITEURS ET
ÉTUDE DE MÉCANISMES RÉACTIONNELS AUTOUR DE LA BIOSYNTHÈSE
D'ANTIBIOTIQUES

RÉSUMÉ :

La cristallographie est une méthode récente dans l'histoire de la pharmacie : il faut attendre le XX^{ème} siècle avant que des médicaments directement développés à partir de la structure des macromolécules n'apparaissent. De nombreux succès thérapeutiques peuvent être cités, comme l'imatinib, les inhibiteurs de la protéase dans le HIV ou encore le dabigatran. Toutefois, le développement de tels médicaments par des méthodes structurales restent limitées du fait de la difficulté de caractériser la structure tridimensionnelle de la cible et de dessiner un ligand ou un inhibiteur efficace.

Le travail de recherche effectué au cours de cette thèse d'exercice illustre l'intérêt des études cristallographique dans le développement de nouvelles thérapeutiques. La protéine NosL est à l'origine par chimie radicalaire de la synthèse de l'acide 3-méthylindolique à partir du L-Tryptophane. Cette moitié indolique est intégrée plus tard dans l'antibiotique nosiheptide, qui n'est pas encore utilisé en clinique du fait de sa trop faible solubilité. Ainsi, il est apparu intéressant d'utiliser la biologie de synthèse, la mutagenèse dirigée et la promiscuité de l'enzyme NosL afin de produire des variants hydrophiles du MIA et à terme modifier le nosiheptide pour le rendre plus soluble et efficace.

MOTS CLÉS : Cristallographie, antibiotiques, cinétiques enzymatiques, chimie radicalaire

FILIÈRE : Industrie - Recherche