

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Biochimie

Ecole doctorale iViv – ED 387

Présentée par

Rémi Ducasse

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

ÉTUDE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DE PEPTIDES LASSO A L'AIDE DE METHODES SPECTROSCOPIQUES

Soutenue le 29 octobre 2012

devant le jury composé de :

Jean-Marc Berjeaud

Isabelle Segalas-Milazzo

Thierry Foulon

Agnès Delmas

Ewen Lescop

Séverine Zirah

Sylvie Rebuffat

Professeur, Université de Poitiers

Professeur, Université de Rouen

Professeur, UPMC

Directrice de recherche, CBM

Chargé de recherche, ICSN

Maître de conférences, MNHN

Professeur, MNHN

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

à Anne

Remerciements

Cette étude a été réalisée au sein de l'unité Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, UMR 7245 CNRS/MNHN (anciennement Chimie et Biochimie des Substances naturelles, UMR 5154) dirigée par Madame le professeur Sylvie Rebuffat. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir permis d'effectuer ces travaux dans cette unité.

Je souhaite remercier Monsieur Jean-Marc Berjeaud, professeur à l'Université de Poitiers (Laboratoire d'Ecologie et Biologie des Interactions, UMR 7267 CNRS) et Madame Isabelle Ségalas-Milazzo, professeur à l'Université de Rouen (Laboratoire de Chimie Organique et Biologie Structurales, COBRA – UMR 6014 CNRS) d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'en être les rapporteurs. Je tiens à remercier aussi Monsieur Thierry Foulon, professeur à l'UPMC (Laboratoire de BIOgenèse des Signaux Peptidiques BIOSIPE, ER3 UPMC), Madame Agnès Delmas, directrice de recherche au CNRS (Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans, UPR 4301) ainsi que Monsieur Ewen Lescop, chargé de recherche au CNRS (Laboratoire de Chimie et Biochimie Structurales, Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette) d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse, Madame Sylvie Rebuffat, professeur au MNHN, de l'unité Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions, pour son soutien et nos conversations toujours constructives, et pour sa disponibilité malgré sa fonction de directrice de l'unité.

Je souhaite remercier particulièrement ma co-directrice de thèse, Madame Séverine Zirah, maître de conférences au MNHN, pour presque tout. Son soutien, son enthousiasme communicatif, son encadrement, ses compétences scientifiques, sa chaleur humaine ont fait de cette thèse une expérience aussi enrichissante sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je remercie Messieurs Alain Blond et Ewen Lescop pour leur encadrement dans le cadre des expériences de RMN. Il leur aura fallu parfois pas mal de patience pour que je commence à maîtriser cette technique mais leurs compétences respectives en modélisation moléculaire et en dynamique des protéines ont permis

de balayer toute difficulté. Qu'ils trouvent ici mes remerciements les plus sincères quant à leur aide et à leur disponibilité, j'ai beaucoup appris à leurs côtés.

Je remercie également Monsieur Christophe Goulard pour tout ce qu'il m'a appris, notamment en purification des protéines. Une grande partie des travaux de cette thèse n'aurait pu aboutir sans son aide. Je le remercie également pour tous les bons moments passés en sa compagnie à discuter de tout et n'importe quoi (merci aussi pour les bouquins et les bandes dessinées !).

Je tiens à remercier aussi Madame Yanyan Li pour sa compétence, son dynamisme et son implication dans le projet lasso du laboratoire dans lequel s'inscrivent ces travaux, ce qui rend ce projet aussi attractif qu'enthousiasmant. Je remercie également Monsieur Kok-Phen Yan, ancien doctorant du laboratoire, pour son aide dans la conception des variants et pour sa gentillesse inébranlable.

Je souhaite remercier Messieurs Arul Marie et Lionel Dubost de la plateforme de spectrométrie de masse pour leur aide précieuse. Je remercie aussi tout particulièrement Madame Manon Vandervennet pour son aide absolument indispensable en microbiologie ainsi que pour sa bonne humeur.

Mes remerciements vont également aux personnes avec qui j'ai pu collaborer au cours de cette thèse, notamment Madame Patrizia Alberti de l'unité Régulations et Dynamique des génomes du Muséum (UMR 7296 CNRS/MNHN – INSERM U565) pour son aide en dichroïsme circulaire, Monsieur Eric Guittet, directeur de recherche au CNRS (Laboratoire de Chimie et Biochimie Structurales, Institut de Chimie des Substances naturelles de Gif-sur-Yvette) pour ses conseils en RMN et l'accès aux spectromètres à très haut champ, ainsi que Monsieur Jean-Luc Pernodet, directeur de recherche au CNRS (Institut de Génétique et de Microbiologie, UMR 8621 CNRS) pour sa contribution essentielle à l'expression hétérologue du système génétique de la svicéucine.

Je souhaite remercier l'ensemble du personnel du laboratoire, en particulier Mesdames Catherine Pougault et Nora Ouache, et Monsieur Brice Molinelli pour leur aide administrative et pour leur disponibilité et leur bonne humeur. Je remercie Monsieur Alexandre Deville pour m'avoir supporté pendant trois ans dans la même pièce, et pour avoir su trouver la bonne blague au bon moment de nombreuses fois. Je tiens à remercier également Monsieur Jean Peduzzi chez lequel je me suis arrêté plus d'une fois (mais pas assez) pour discuter de science mais aussi (et surtout) de

l'état de la recherche en France et qui a su me transmettre une partie de son énergie pour l'avenir. Je n'oublie pas Mesdames Alyssa Carré-Mlouka, Marie-Lise Bourguet Kondracki et Arlette Longeon pour les discussions que nous avons pu avoir, notamment au cours de nos séminaires d'équipe. Je remercie aussi très chaleureusement Mesdames Carine Lombard, Hélène Barreteau, Cléa Bauvais et Messieurs Samuel Dupont et Florent Vandervennet pour tous ces précieux et bons moments passés en leur compagnie sans lesquels une thèse ne serait pas tout-à-fait une thèse. Je remercie également les post-doctorants Marie Pérot-Taillandier et Jean-Baptiste Rioux pour nos discussions. Je leur souhaite le meilleur pour la suite.

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus profonds et les plus chaleureux à ma famille. A mes parents, tout d'abord, qui ont toujours été présents et qui m'ont soutenu sur tous les plans, quelles que soient les circonstances. Je ne saurai trouver assez de mots pour vous exprimer ici l'étendue de ma reconnaissance. Je remercie, bien sûr, ma sœur Claire et mon frère Louis pour tous les agréables moments passés en leur présence. Je remercie également mes grands-parents pour l'intérêt non feint qu'ils ont porté à mon travail pendant ces trois ans.

Enfin, je souhaite terminer ces remerciements par mes amis, sur qui j'ai toujours pu compter. Je remercie les copains de l'ESPCI, Jess, Mathieu, Ulysse, Lucie, Charlélie, Will, Matthieu et Cécile, pour les moments de franche rigolade, les bons repas et les soirées jeux (un p'tit Troie ?). Je remercie les copains de Bordeaux, restés au pays ou éparpillés aux quatre coins du monde, Jo, Cécile (et la petite Malory !), Matthieu, Vio, Léo, Mathieu, Sophie, PV, Tanguy, Damien... pour leur amitié indéfectible qui m'est indispensable.

Table des matières

Remerciements.....	i
Table des matières	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Constantes mathématiques	xix
Notations.....	xxi
Introduction générale.....	1
Chapitre I : Biosynthèse et activité des structures peptidiques compactes.....	5
Introduction.....	5
I. Peptides compacts produits par la voie ribosomale	6
I.1. Peptides synthétisés par les eucaryotes	6
I.1.1. Défensines circulaires.....	6
I.1.1.1. Biosynthèse et activité biologique	7
I.1.1.2. Structures tridimensionnelles et mécanisme d'action	8
I.1.1.3. Activités biologiques des défensines circulaires	8
I.1.2. Cyclotides.....	9
I.1.2.1. Biosynthèse	10
I.1.2.2. Diversité structurale.....	11
I.1.2.3. Activités biologiques	13
I.1.2.4. Bioingénierie des cyclotides	14
I.1.3. Conotoxines	15
I.1.3.1. Biosynthèse	15
I.1.3.2. Activités biologiques	16
I.1.3.3. Structures tridimensionnelles.....	18
I.1.3.4. Bioingénierie des conotoxines	19
I.2. Peptides synthétisés par les procaryotes	19
I.2.1. Les bactériocines	19
I.2.2. Bactériocines à structure compacte.....	21
I.2.2.1. Lantibiotiques	21
I.2.2.1.1. Biosynthèse.....	21
I.2.2.1.2. Diversité	23
I.2.2.1.3. Structures tridimensionnelles	24
I.2.2.1.4. Activités biologiques.....	25
I.2.2.2. Bactériocines circulaires.....	26
I.2.2.2.1. Biosynthèse.....	26
I.2.2.2.2. Origine et structures tridimensionnelles	27
I.2.2.2.3. Activités biologiques et rôles écologiques.....	28
II. Les peptides lasso	29
II.1. Découverte des peptides lasso.....	29
II.2. La microcine J25, peptide lasso modèle.....	31
II.2.1. Etude de la biosynthèse et de la sécrétion de MccJ25	31
II.2.1.1. Détermination du système génétique de MccJ25	31
II.2.1.2. Mécanisme de maturation de MccJ25	33
II.2.1.3. Régulation de la biosynthèse de MccJ25.....	35
II.2.1.4. Export du peptide mature	36
II.2.2. Structure tridimensionnelle de MccJ25.....	38

II.2.3. Mécanisme d'action de MccJ25	39
II.2.3.1. Import du peptide dans le milieu intracellulaire	39
II.2.3.2. Cibles du peptide.....	41
II.2.4. Relations structure-activité	42
II.2.4.1. Interaction avec les protéines d'import.....	42
II.2.4.2. Liaison avec la membrane cellulaire	44
II.2.4.3. Production de superoxyde	44
II.2.4.4. Interaction avec l'ARNpol.....	44
II.2.5. Exploitation du potentiel bioactif de MccJ25	46
II.3. Les autres peptides lasso.....	49
II.3.1. Biosynthèse	49
II.3.2. Activités biologiques des peptides lasso	50
II.3.2.1. Antagonisme de récepteurs aux hormones.....	50
II.3.2.2. Activité antibactérienne	53
II.3.2.3. Activité antivirale.....	54
II.3.2.4. Activité inhibitrice d'enzymes autres que l'ARNpol.....	54
II.3.3. Structures tridimensionnelles	55
II.3.3.1. Peptides lasso de classe I	55
II.3.3.2. Peptides lasso de classe II	56
II.3.3.3. Peptide lasso de classe III	58
Conclusion	58
Matériel et méthodes.....	61
I.1. Souches bactériennes	61
I.2. Milieux de culture	61
I.2.1. Milieux liquides	61
I.2.2. Milieux solides	62
I.3. Plasmides	62
I.4. Transformation des bactéries	63
I.4.1. Préparation des cellules compétentes chimiquement et transformation	63
I.4.2. Préparation des cellules électro-compétentes et électroporation	63
I.5. Mutagenèse dirigée	64
II. Expression et production des peptides	64
II.1. MccJ25 et ses variants	64
II.1.1. Production.....	64
II.1.2. Isolement et purification	65
II.2. Svicéucine.....	66
II.2.1. Production.....	66
II.2.2. Isolement et purification	66
II.2.3. Réduction-alkylation de la svicéucine.....	67
II.3. Capistruine.....	67
II.3.1. Production.....	67
II.3.2. Isolement et purification	67
III. Activité biologique des peptides	68
III.1. Milieu solide	68
III.2. Milieu liquide (CMI).....	68
IV. Caractérisation structurale des peptides	69
IV.1. Digestion enzymatique de MccJ25 et de ses variants	69
IV.1.1. Thermolysine	69
IV.1.2. Carboxypeptidase Y.....	69
IV.2. Etude conformationnelle par dichroïsme circulaire (CD).....	70
IV.2.1. Principe du CD.....	70
IV.2.2. Enregistrement des spectres	71
IV.3. Etude par spectrométrie de masse (MS).....	71
IV.3.1. Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice couplée à un analyseur « temps de vol » (MALDI-TOF)	72
IV.3.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)	72

IV.4. Etude structurale de peptides par résonance magnétique nucléaire (RMN)	73
IV.4.1. Instrumentation	73
IV.4.2. Séquences RMN à deux dimensions (2D) utilisées	73
IV.4.2.1. Suppression du signal du solvant	73
IV.4.2.2. COrrrelation SpectroscopY (COSY)	75
IV.4.2.3. Double-Quantum Filtered COrrrelation SpectroscopY (COSY-DQF)	75
IV.4.2.4. TOtal Correlation SpectroscopY (TOCSY)	76
IV.4.2.5. Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY (NOESY)	76
IV.4.2.6. Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY (ROESY)	77
IV.4.2.7. Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC)	78
IV.4.2.8. Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (HMBC)	79
IV.4.3. MccJ25 et ses variants	79
IV.4.3.1. Préparation des échantillons	79
IV.4.3.2. Calibration des spectres	79
IV.4.3.3. Séquences utilisées et paramètres d'acquisition	80
IV.4.3.4. Analyse des spectres	80
IV.4.4. Svicéucine	80
IV.4.4.1. Préparation des échantillons	80
IV.4.4.2. Calibration des spectres	81
IV.4.4.3. Séquences utilisées et paramètres d'acquisition	81
IV.5. Modélisation moléculaire sous contraintes RMN	82
IV.5.1. Attribution séquentielle	82
IV.5.2. Contraintes de distances NOEs et angles ϕ	83
IV.5.3. Détermination des ponts disulfure	84
IV.5.4. Protocole de modélisation moléculaire	85
IV.5.4.1. Principe de la modélisation moléculaire	85
IV.5.4.2. Protocole (X-PLOR) utilisé dans la modélisation	86
IV.5.4.3. Génération des structures	87
IV.5.4.4. Optimisation des structures	90
IV.5.4.5. Validation des structures	90
V. Etude de la dynamique de protéine par relaxation de spin ^{15}N	90
V.1. Principe et intérêt de l'étude dynamique des protéines	90
V.2. Les expériences de mesure de relaxation de spin ^{15}N	92
V.2.1. La relaxation longitudinale R_1	92
V.2.2. La relaxation transverse R_2	93
V.2.3. L'effet Overhauser nucléaire hétéronucléaire à l'état stationnaire	94
V.3. Relation entre les paramètres de relaxation ^{15}N et la dynamique d'une protéine	95
V.3.1. Relation entre les fonctions de densité spectrale et les paramètres de relaxation ^{15}N	95
V.3.2. Description dynamique d'une protéine	96
V.3.3. Approche « model-free » de modélisation de la dynamique d'une protéine	96
V.3.3.1. Tenseur de diffusion	97
V.3.3.2. « Model-free » des résidus	97
V.3.3.3. Cohérence du modèle calculé	99
V.4. Instrumentation	99
V.5. Obtention et préparation des échantillons	100
V.6. Séquences et acquisition des spectres	100
V.7. Traitement des données	102

Chapitre II : Eléments de séquence et de topologie nécessaires à la structure lasso, exemple de la microcine J25 105

Publication : Sequence determinants governing the topology and the biological activity of a lasso peptide, microcin J25 (2012) *ChemBioChem* **13**: 371-380

Chapitre III : Isolement, purification et caractérisation structurale d'un nouveau peptide lasso de type I 133

Introduction.....	133
I. Isolement et purification de la svicéucine	133
I.1. Exploration de génome.....	133
I.2. Production hétérologue de la svicéucine et purification.....	135
I.3. Caractérisation de la svicéucine par MS.....	135
II. Activité antimicrobienne de la svicéucine	136
III. Caractérisation structurale de la svicéucine par modélisation moléculaire sous contraintes RMN	137
III.1. Enregistrement et analyse des spectres RMN 2D.....	137
III.1.1. Déplacements chimiques et corrélations des protons	137
III.1.2. Détermination de l'appariement des ponts disulfure	141
III.1.3. Paramètres conformationnels	142
III.2. Modélisation sous contraintes RMN.....	144
III.3. Structure tridimensionnelle de la svicéucine	145
Conclusion	149
Chapitre IV : Etudes spectroscopiques de peptides lasso	151
Introduction.....	151
I. Dynamique de MccJ25 par relaxation de spin ^{15}N	151
I.1. Structures tridimensionnelles de MccJ25 et spectres HSQC	151
I.2. Détermination des paramètres de relaxation ^{15}N (R_1 , R_2 et $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -hetNOE)	155
I.3. Calcul des paramètres dynamiques par approche « model-free »	157
II. Dichroïsme circulaire de peptides lasso.....	163
II.1. Comparaison des signaux CD de peptides lasso	163
II.2. Dichroïsme circulaire de MccJ25 et de ses variants	164
II.3. Dichroïsme circulaire de la svicéucine et de ses formes réduites et alkylées	165
II.4. Interprétation des résultats	166
Conclusion	167
Discussion générale – conclusions et perspectives	169
Bibliographie	175
Annexes	I
Annexe 1 : Tableau récapitulatif des structures PDB présentées	I
Annexe 2 : Fichiers de contraintes de distance et d'angles utilisés pour la modélisation moléculaire de la svicéucine.....	II
Annexe 3 : Spectres HSQC de MccJ25- ^{15}N à différentes températures	VII
Annexe 4 : Relaxation de spin ^{15}N de MccJ25 dans H_2O , à 600 MHz	VIII
Annexe 5 : Analyse des formes réduites et alkylées de la svicéucine	X

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de biosynthèse des θ -défensines animales.....	7
Figure 2 : Structures tridimensionnelle de la θ -défensine rhésus-1 et de la rétrocycline 2.....	8
Figure 3 : Trimère de la rétrocycline 2 vu de « dessous ».	9
Figure 4 : Fleurs d' <i>Oldenlandia affinis</i> (Rubiaceae), de <i>Viola odorata</i> (Violaceae) et de <i>Momordica cochinchinensis</i> (Cucurbitaceae), trois plantes productrices de cyclotides.	10
Figure 5 : Biosynthèse de la kalata B1.....	10
Figure 6 : Diagramme représentant la diversité dans la séquence des cyclotides.	11
Figure 7 : Sélection de structures tridimensionnelles de cyclotides de type A) Möbius ; B) inhibiteur de trypsine et C) bracelet	13
Figure 8 : Représentation des résidus hydrophobes de A) kalata B1 et B) kalata B7.	14
Figure 9 : <i>Conus geographus</i> , <i>Conus imperialis</i> et <i>Conus marmoreus</i> , et <i>radulae</i> du mollusque (<i>C. striatus</i> et <i>C. geographus</i>) lui servant à harponner sa proie et à lui injecter son venin dans le corps.	15
Figure 10 : Biosynthèse des conotoxines.	16
Figure 11 : Structures tridimensionnelles de représentants des différentes familles de conotoxines.....	18
Figure 12 : Schéma général de biosynthèse des bactériocines (dont lantibiotiques, bactériocines circulaires et peptides lasso).	20
Figure 13 : Mécanisme de formation des cycles lanthionine et méthyllanthionine.	21
Figure 14 : Mécanisme de biosynthèse de la nisine A.....	23
Figure 15 : Structures de la nisine A et de la mersacidine.....	25
Figure 16 : Site de liaison de la nisine au lipide II de la membrane plasmique.....	25
Figure 17 : Schéma de synthèse des bactériocines circulaires.	27
Figure 18 : Structures tridimensionnelles de trois bactériocines circulaires.....	28
Figure 19 : Mécanisme d'action de l'entérocyne AS-48.....	29
Figure 20 : Système génétique de MccJ25.....	33
Figure 21 : Mécanisme de maturation de MccJ25 proposé.	35
Figure 22 : Structure tridimensionnelle de la protéine transmembranaire TolC et mécanisme d'export de MccJ25 proposé par Vincent <i>et al.</i>	37
Figure 23 : Structures tridimensionnelles de A) MccJ25 et B) MccJ25 digérée par la	

thermolysine.....	38
Figure 24 : Représentation des ions bi-peptidiques obtenus par dissociation induite par collision de MccJ25.....	39
Figure 25 : Structure tridimensionnelle du récepteur aux sidérophores FhuA.....	40
Figure 26 : Mécanisme d'action de MccJ25.....	42
Figure 27 : A) Structure tridimensionnelle de l'ARNpol. B) Zoom sur la zone d'interaction de MccJ25 avec l'ARNpol.	45
Figure 28 : Régions structurales impliquées dans le mécanisme d'action de MccJ25.	46
Figure 29 : Variabilité de chaque position de la séquence peptidique de MccJ25 permettant de conserver l'activité antibactérienne.....	48
Figure 30 : Schéma de biosynthèse des peptides lasso.....	49
Figure 31 : Structures des endothélines.	51
Figure 32 : Synthèse de peptide hybride entre RES-701-1 et ET-1.....	52
Figure 33 : Structure tridimensionnelle du glucagon.....	52
Figure 34 : Structures tridimensionnelles de peptides lasso.....	56
Figure 35 : Spectres CD de l'UV lointain des différents types de structure secondaire d'une protéine.....	71
Figure 36 : Séquence d'impulsions WATERGATE binomiale 3-9-19.	74
Figure 37 : Séquence d'impulsions excitation sculpting.....	74
Figure 38 : Séquence d'impulsions COSY.....	75
Figure 39 : Séquence d'impulsions COSY-DQF.....	75
Figure 40 : Séquence d'impulsions TOCSY MLEV-17.....	76
Figure 41 : Séquence d'impulsions TOCSY DIPSI-2.....	76
Figure 42 : Séquence d'impulsions NOESY.	77
Figure 43 : Séquence d'impulsions ROESY.	78
Figure 44 : Séquence d'impulsion HSQC.	78
Figure 45 : Séquence d'impulsions HMBC.	79
Figure 46 : Protocole général utilisé dans la modélisation moléculaire sous contraintes RMN de la svicéucine.	88
Figure 47 : Echelle de temps de la dynamique des protéines.	92

Figure 48 : Enregistrement du signal de relaxation R_1 (« inversion-recovery »).	93
Figure 49 : Enregistrement du signal de relaxation R_2 (« spin-echo »).	94
Figure 50 : Séquence d'impulsions pour l'enregistrement de R_1 .	100
Figure 51 : Séquence d'impulsions pour l'enregistrement de R_2 .	101
Figure 52 : Séquence d'impulsions pour l'enregistrement de $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -hetNOE.	101
Figure 53 : Système génétique de la svicécucine identifié par exploration de génome.	134
Figure 54 : Spectre de masse en mode tandem de la svicécucine.	136
Figure 55 : Spectres A) TOCSY (80 ms) et B) NOESY (150 ms) de la svicécucine (2,4 mM, d_3 -MeOH, 600 MHz, 298 K, $\omega_1 = 6,5 - 9,5$ ppm et $\omega_2 = 0 - 5,7$ ppm).	138
Figure 56 : Comparaison des régions des corrélations H_α - H_α ($\omega_1 = 5 - 6$ ppm et $\omega_2 = 4 - 5$ ppm) pour A) la svicécucine et B) MccJ25, montrant la tache de corrélation spécifique d'un feuillet β antiparallèle.	140
Figure 57 : Spectre HSQC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ de la svicécucine dans la région $\omega_1 = 7,5 - 11$ ppm et $\omega_2 = 105 - 130$ ppm (d_3 -MeOH, 600 MHz, 298 K).	140
Figure 58 : Régions des déplacements chimiques des corrélations entre protons H_α et H_β (NOESY, 300 ms, 298 K, H_2O , 950 MHz).	142
Figure 59 : Représentation graphique des coefficients de température et des CSD- H_α des résidus de la svicécucine.	143
Figure 60 : Schéma du protocole de modélisation de la svicécucine.	145
Figure 61 : Diagramme de Ramachandran des résidus des 20 structures sélectionnées de la svicécucine.	146
Figure 62 : Représentation de l'écart quadratique moyen (RMSD) en Å entre la structure moyenne et la famille de structures (X-PLOR).	147
Figure 63 : A) Superposition des 20 structures sélectionnées. B) Structure de la svicécucine.	147
Figure 64 : Superposition des structures tridimensionnelles de la svicécucine et de RP-71955.	148
Figure 65 : Comparaison de la répartition de la polarité à la surface de RP-71955 et la svicécucine.	149
Figure 66 : Superposition des deux familles de structures de MccJ25 déposées dans la PDB.	152
Figure 67 : A) Spectre HSQC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ de MccJ25- ^{15}N à 308 K (H_2O , 950 MHz). B) Représentation des résidus selon leur différence de déplacements chimiques ^1H (H_2O , 308 K, 950 MHz) entre les deux conformations de MccJ25.	153
Figure 68 : Paramètres R_1 (en s^{-1}), R_2 (en s^{-1}) et $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -hetNOE de MccJ25 enregistrés dans	

MeOH, à 700 MHz, à 288 K, 298 K et 308 K.	155
Figure 69 : Paramètres R_1 (en s^{-1}), R_2 (en s^{-1}) et $\{^1H\}^{15}N$ -hetNOE de MccJ25 enregistrés dans H_2O , à 950 MHz à 288 K, 298 K et 308 K.	156
Figure 70 : Paramètres « model-free » de MccJ25 dans MeOH à 700 MHz et H_2O à 950 MHz.	160
Figure 71 : Représentation des résidus de MccJ25 selon leur paramètre d'ordre S^2 dans MeOH à 298 K et à 308 K.	162
Figure 72 : Représentation des résidus de MccJ25 selon leur paramètre d'ordre S^2 dans H_2O de 288 K à 308 K. Les données utilisées ont été enregistrées à 950 MHz.	162
Figure 73 : A) Spectres CD de peptides lasso et de leurs topoisomères cycliques branchés dans MeOH- H_2O 1:1 v/v. B) Spectres CD de peptides lasso dans H_2O	164
Figure 74 : Spectres CD de MccJ25 et de ses variants dans MeOH- H_2O 1:1 v/v.	165
Figure 75 : Spectres CD de la svicéucine et de ses formes réduites dans MeOH- H_2O 1:1 v/v.	166
Figure 76 : Spectres HSQC $^1H/^{15}N$ de MccJ25- ^{15}N à différentes températures (d_3 -MeOH, 700 MHz).	VII
Figure 77 : Paramètres de relaxation ^{15}N de MccJ25 (H_2O , 600 MHz).	VIII
Figure 78 : Paramètres dynamique de MccJ25 (H_2O , 600 MHz).	IX
Figure 79 : Représentation des résidus de MccJ25 selon leur paramètre d'ordre S^2 dans H_2O de 288 K à 308 K.	IX
Figure 79 : Analyse LC-MS de la svicéucine réduite et alkylée.	X

Liste des tableaux

Tableau 1 : Séquences des θ -défensines isolées et dont l'activité a été étudiée.	8
Tableau 2 : Sélection de séquences de cyclotides dont la structure tridimensionnelle a été résolue.	12
Tableau 3 : Exemples de représentants des différentes familles de conotoxines.	17
Tableau 4 : Exemples de représentants des trois classes de lantibiotiques.	24
Tableau 5 : Nom et origine des bactériocines circulaires connues à ce jour.	27
Tableau 6 : Tableau des classes de peptide lasso, de leurs structures et de leurs activités biologiques.	32
Tableau 7 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude.	61
Tableau 8 : Plasmides utilisés dans cette étude.	62
Tableau 9 : Expériences RMN réalisées dans le cadre de l'étude de la structure de MccJ25 et de ses variants.	80
Tableau 10 : Expériences RMN réalisées dans le cadre de la modélisation de svcéucine. .	81
Tableau 11 : Expression des termes énergétiques utilisés dans les calculs de modélisation moléculaire.	86
Tableau 12 : Relations entre les paramètres de relaxation et les fonctions de densité spectrale réduite.	95
Tableau 13 : Différents modèles et leurs paramètres associés pour modéliser la dynamique interne des molécules ²⁶¹	98
Tableau 14 : Expériences réalisées dans le cadre de la relaxation de spin ¹⁵ N de MccJ25.	102
Tableau 15 : Mesure de l'activité antimicrobienne (CMI) de la svcéucine.	137
Tableau 16 : Déplacements chimiques des protons de la svcéucine en ppm (298 K, d3-MeOH, 600 MHz).	139
Tableau 17 : Déplacements chimiques des ¹³ C et des ¹⁵ N de la svcéucine en ppm (298 K, d3-MeOH, 600 MHz).	141
Tableau 18 : Constantes de couplage, coefficients de température des protons amides et CSD des résidus de la svcéucine. n.d. : non-déterminé.	143
Tableau 19 : Paramètres énergétiques et structuraux des 20 structures sélectionnées de la svcéucine.	146
Tableau 20 : Différences de déplacements chimiques ¹ H et ¹⁵ N entre les deux formes des résidus de MccJ25 (H ₂ O, 950 MHz, 308 K).	154

Tableau 21 : Paramètres de relaxation ^{15}N moyens de MccJ25 dans les deux solvants et à trois températures différentes.	157
Tableau 22 : Tenseurs de diffusion isotropes de MccJ25 en entier et de ses régions dans chaque solvant et à différentes températures.	158
Tableau 23 : Paramètres d'ordre moyen de MccJ25 en entier, de sa boucle et de son cycle macrolactame associé à sa queue C-terminale.	160
Tableau 24 : Séquence, nombre de résidus constituant la boucle et nature des résidus aromatiques à proximité directe du cycle macrolactame des peptides caractérisés par CD.	173
Tableau 25 : Paramètres de relaxation ^{15}N moyens de MccJ25 à trois températures différentes.	VIII
Tableau 26 : Tenseurs de diffusion isotropes de MccJ25 en entier et de ses régions à différentes températures.	VIII

Liste des abréviations

ABC	« ATP-binding cassette »
ACN	acétonitrile
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine di-phosphate
AF	acide formique
AMPc	adénosine mono-phosphate cyclique
ANF	facteur auriculaire natriurétique
ARN	acide ribonucléique
ARNpol	ARN polymérase
ATP	adénosine tri-phosphate
BMRB	« biological magnetic resonance bank »
CFU	« colony forming unit »
Cl ₅₀	concentration inhibitrice médiane
Cm	chloramphénicol
CMI	concentration minimale inhibitrice
CPMG	séquence Carr-Purcell-Meiboom-Gill
COSY	« correlation spectroscopy »
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
ER	région de liaison au réticulum endoplasmique
ESI	ionisation par électronébulisation
ET-1, ET-2, ET-3	endothéline 1, 2, 3
ET _A , ET _B	récepteur aux endothélines de type A, B
FITC	isothiocyanate de fluorescéine
FT-ICR	« Fourier transform ion cyclotron resonance »
HCCA	acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
HIV-1	virus d'immunodéficience humaine (« human immunodeficiency virus »)
HMBC	« heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy »

HPLC	chromatographie liquide à haute performance (« high performance liquid chromatography »)
HSQC	« heteronuclear single-bond correlation spectroscopy »
HSV	virus <i>Herpes simplex</i>
LB	Luria-Bertani
LC-MS	chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
MALDI	désorption-ionisation laser assistée par matrice
MccJ25	microcine J25
MeOH	méthanol
MLCK	kinase de la chaîne légère de la myosine
MPTP	pores de transition de perméabilité mitochondriale
MS	spectrométrie de masse
MS/MS	spectrométrie de masse en mode tandem
nAChR	récepteur nicotinique à l'acétylcholine
NOESY	« nuclear Overhauser effect spectroscopy »
NRPS	peptide synthétisé par la voie non-ribosomale (« non-ribosomal peptide synthesis »)
NTP	nucléoside tri-phosphate
NTR	region N-terminale
ORF	phase ouverte de lecture (« open reading frame »)
PB	poor broth
PCR	« polymerase chain reaction »
PDB	« protein data bank »
RDC	couplage dipolaire résiduel (« residual dipolar coupling »)
RiPPs	peptide synthétisé par la voie ribosomale et modifié post-traductionnellement (« ribosomally-synthesized and post-translationally-modified peptides »)
RMN	résonance magnétique nucléaire
RMSD	« root-mean-square deviation »
ROESY	« rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy »
RTD-1, RTD-2, RTD-3	θ -défensines rhésus 1, 2, 3
RX	rayons X

SPE	« solid phase extraction »
TOCSY	« total correlation spectroscopy »
TOF	temps-de-vol (« time-of-flight »)
UV	ultraviolet
VdW	van der Waals
VEGF	facteur de croissance des vaisseaux sanguins endothéliaux
4-VP	4-vinylpyridine

Constantes mathématiques

Nom	Expression
Constante diélectrique du vide	$\varepsilon_0 = \frac{1}{\mu_0 c^2} = 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$
Constante de Boltzmann	$k_B = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$
Perméabilité du vide	$\mu_0 = 12,57 \cdot 10^{-7} \text{ T.m.A}^{-1}$
Rapport gyromagnétique de ^1H	$\gamma_H = 2,675 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$
Rapport gyromagnétique de ^{15}N	$\gamma_N = -2,713 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$
Rapport gyromagnétique de ^{13}C	$\gamma_C = 6,728 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1}$
Vitesse de la lumière	$c = 299\,792\,458 \text{ m.s}^{-1}$
Constante de Planck	$h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J.s}^{-1}$

Notations

Notation des acides aminés

Alanine	A	Ala	Leucine	L	Leu
Arginine	R	Arg	Lysine	K	Lys
Asparagine	N	Asn	Méthionine	M	Met
Aspartate	D	Asp	Phénylalanine	F	Phe
Cystéine	C	Cys	Proline	P	Pro
Glutamate	E	Glu	Sérine	S	Ser
Glutamine	Q	Gln	Thréonine	T	Thr
Glycine	G	Gly	Tryptophane	W	Trp
Histidine	H	His	Tyrosine	Y	Tyr
Isoleucine	I	Ile	Valine	V	Val

Représentation des structures protéiques

Les structures des peptides et des protéines déposées dans la PDB présentées dans cette thèse ont été représentées à l'aide du logiciel PyMol. Les boucles des structures ont été représentées en vert, les hélices α en rouge, les feuillets β en jaune et les ponts disulfure en orange.

Notation des variants de MccJ25

Les variants de MccJ25 obtenus par mutagenèse dirigée sont notés selon le type de mutation qu'ils présentent. Un variant présentant la substitution d'un résidu X par un résidu Y en position 1 de la séquence sera appelé MccJ25[X1Y]. Un variant présentant la délétion des résidus X, Y et Z sera appelé MccJ25[Δ XYZ]. Un variant présentant l'insertion d'un résidu X entre les positions 1 et 2 sera appelé MccJ25[insX1-2].

Notation des ions obtenus par MS/MS

La fragmentation par MS/MS de peptides lasso donne des ions bi-peptidiques particuliers en plus des ions usuels b (acylium) et y (immonium). Un ion bi-peptidique mono-charge résultant de la fragmentation dans la boucle du peptide et présentant une délétion des résidus X, Y et Z sera noté $\{M-[XYZ]\}^+$.

Introduction générale

Les substances isolées des organismes vivants, ou substances naturelles, sont une source majeure de molécules aux activités biologiques intéressantes¹. Des molécules comme le paclitaxel, commercialisée sous le nom de taxol et utilisée dans les traitements anticancéreux, ou l'artémisinine, un antipaludique puissant, proviennent de l'analyse des molécules toxiques des végétaux. L'étude des substances naturelles a permis des avancées majeures autant dans notre compréhension de la biologie des interactions entre les organismes et leur environnement que dans la médecine, pour l'exploitation de leurs activités thérapeutiques².

Au cours du XX^e siècle, quatre grands groupes de substances naturelles ont été identifiés³ : les terpénoïdes, les alcaloïdes, les polykétides et les peptides produits par la voie non-ribosomale (NRPS). A ces quatre groupes vient s'ajouter une cinquième classe de substances naturelles qui a fait l'objet d'une attention grandissante depuis la dernière décennie : les peptides produits par la voie ribosomale et modifiés post-traductionnellement (RiPPs).

Cette classe de peptides est présente chez les procaryotes et les eucaryotes. Les modifications post-traductionnelles qu'ils présentent leur procurent une diversité structurale intéressante et leur production par la voie ribosomale rend plus aisée la manipulation génétique de leurs séquences. La plupart des modifications post-traductionnelles porte sur la rigidification du peptide, le stabilisant dans une conformation favorable pour son activité. Le peptide modifié est alors plus facilement reconnu par sa cible, possède une structure compacte plus stable ou présente un site réactionnel plus efficace. Les RiPPs jouent le rôle de substances de défense (peptides antimicrobiens) ou d'attaque (toxines). Leur structure permet une stabilité accrue contre les dégradations chimiques, protéolytiques ou physiques. Ceci renforce l'activité des peptides en augmentant leur durée de vie.

Chez les eucaryotes, des RiPPs de structure compacte participent à l'immunité innée. Ils sont impliqués dans des phénomènes de défense de l'organisme dans un environnement riche en micro-organismes. Par exemple, les défensines de mammifères⁴ sont synthétisées par des cellules en contact permanent avec des micro-organismes comme les neutrophiles du sang, les cellules de Paneth

de l'épithélium intestinal, de l'épiderme ou de la trachée. Les cyclotides^{5,6} sont des molécules de défense des plantes produits par les organes aériens des plantes. La famille des conotoxines⁷, produites par des mollusques du genre *Conus*, se distingue des autres structures peptidiques compactes eucaryotes par le fait que ces molécules servent à la nutrition en paralysant les proies de l'organisme producteur.

Chez les procaryotes, les peptides de structure compacte sont pour beaucoup issus de la voie non-ribosomale. Toutefois, certains peptides antimicrobiens issus de la voie ribosomale (bactériocines⁸, microcines⁹) témoignent d'une grande diversité de structures. Les peptides « lasso »¹⁰, en particulier, offrent un exemple remarquable de stabilité d'une structure peptidique.

L'avancée technologique que les méthodes spectroscopiques ont connue ces dernières années a fourni aux chercheurs de nouveaux outils pour la compréhension de ces molécules si particulières. La spectrométrie de masse (MS), la résonance magnétique nucléaire (RMN) ou encore le dichroïsme circulaire (CD) sont autant de méthodes de précision qui, utilisées conjointement, participent à cette dynamique.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse.

L'équipe Molécules de Défense et de Communication dans les Ecosystèmes Microbiens de l'unité Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes (UMR 7245 CNRS/MNHN) du Muséum national d'Histoire naturelle s'intéresse particulièrement aux mécanismes de biosynthèse, aux mécanismes d'action et aux relations entre la structure et l'activité des peptides antimicrobiens d'origine bactérienne, et plus particulièrement des peptides lasso.

Mon travail de thèse a porté sur l'étude structurale et fonctionnelle de ces peptides originaux. Produits par des bactéries à Gram positif (*Streptomyces*) autant qu'à Gram négatif (*Escherichia*), les peptides lasso possèdent une structure entrelacée de type rotaxane. Leurs activités biologiques en tant qu'antagonistes de récepteurs, inhibiteurs d'enzymes et/ou antimicrobiens ou antiviraux associées à leurs structures stables et compactes, leur confèrent une grande potentialité biotechnologique.

Le **chapitre I** consiste en une étude bibliographique portant sur les RiPPs de structure compacte, avec une présentation des principaux représentants de ces peptides chez les eucaryotes et les procaryotes, suivie d'une partie plus détaillée

dédiée aux peptides lasso.

Les protocoles expérimentaux utilisés sont décrits dans la partie **Matériel et méthodes**.

Le **chapitre II** présente les résultats d'une étude structure/activité d'un peptide lasso produit par *Escherichia coli*, la microcine J25 (MccJ25). Ces résultats sont présentés sous forme d'un article paru en 2012 dans la revue *ChemBioChem*.

Le **chapitre III** décrit la résolution de la structure tridimensionnelle par modélisation moléculaire sous contraintes RMN d'un nouveau peptide lasso découvert par l'exploration de génomes, produit par *Streptomyces sviveus*, la svicéucine.

Le **chapitre IV** rassemble les résultats d'une étude de différents peptides lasso à l'aide de méthodes spectroscopiques. Il comporte une partie dédiée à l'analyse des mouvements internes de MccJ25 grâce à la relaxation de spin ^{15}N par RMN, suivie d'une étude par CD de différents peptides lasso et de variants visant à mettre en évidence une signature de la topologie lasso.

Enfin, une **Discussion** de ces résultats permet d'apporter quelques conclusions sur ce travail et d'ouvrir sur de nouvelles perspectives sur l'étude de ces peptides originaux.

Chapitre I : Biosynthèse et activité des structures peptidiques compactes

Introduction

La synthèse d'une molécule biologique est coûteuse en énergie et en nutriments pour l'organisme producteur. Or le milieu dans lequel cette molécule est exportée est souvent déstabilisant pour les peptides et les protéines qui doivent résister aux dégradations physiques, chimiques et protéolytiques. Quand la molécule synthétisée est nécessaire à la survie de l'individu, l'évolution a sélectionné deux recours pour que celui-ci dépasse la faible durée de vie de sa production : puiser dans ses ressources énergétiques pour (i) produire une molécule en grande quantité mais fragile ou (ii) augmenter la durée de vie de la molécule en optimisant sa structure tridimensionnelle afin qu'elle soit plus résistante.

Les molécules présentées ici sont le fruit de la deuxième stratégie. Ces structures peptidiques compactes présentent toutes une remarquable stabilité physico-chimique. Nous avons choisi de nous focaliser sur les structures peptidiques synthétisées par la voie ribosomale et modifiées post-traductionnellement (RiPPs), par opposition aux peptides synthétisés de manière non-ribosomale (NRPS), pour mettre en lumière leur diversité de voies de biosynthèse, de structures et d'activités biologiques. Les RiPPs regroupent un grand nombre de substances naturelles présentant une similarité dans leur biosynthèse : les lantibiotiques, les linaridines, les cyanobactines, les thiopeptides, les microcines, les peptides lasso, les microviridines, les sactipeptides, les bactériocines circulaires, les amatoxines, les phallotoxines, les cyclotides et enfin les orbitides³. Certaines de ces substances présentent une structure compacte qui les stabilise et renforce leur activité. Fort de l'engouement que provoque ces peptides, le *Journal of Biological Chemistry* dans son édition du 3 août 2012 (**287**) leur a consacré un dossier¹¹ qui appuie notamment sur leur importance dans le développement de nouvelles stratégies de synthèse de composés thérapeutiques^{12,13}.

Face à cette diversité, nous avons choisi de présenter dans un premier temps quelques exemples de ces peptides modifiés aux activités

intéressantes d'origine eucaryote ou procaryote : les **défensines circulaires** isolées chez les primates, les **cyclotides** synthétisés par des végétaux et les **conotoxines** découvertes dans le venin de mollusques ; les **lantibiotiques** et les **bactériocines circulaires** produits par des procaryotes. Nous présenterons ensuite une dernière classe de peptides compacts, les **peptides lasso**, dont la structure est particulièrement originale et qui font l'objet de mon travail de thèse. Parmi ces derniers, une attention particulière sera apportée à l'étude de la **microcine J25** (MccJ25), ce qui nous permettra de dégager les caractéristiques de biosynthèse de cette famille, son originalité structurale ainsi que des perspectives biotechnologiques s'appuyant sur l'activité biologique de ces peptides alliée à leur structure très stable.

I. Peptides compacts produits par la voie ribosomale

I.1. Peptides synthétisés par les eucaryotes

I.1.1. Défensines circulaires

Les défensines constituent avec les cathélicidines les deux familles de peptides antimicrobiens que l'on retrouve chez les mammifères, dont les humains, et qui participent à l'immunité innée^{4,14}. Généralement catégorisées en deux sous-familles α et β , les défensines sont des peptides cationiques possédant trois ponts disulfure dont la séquence comprend entre 29 et 42 acides aminés et qui montrent une activité antimicrobienne à large spectre, importante *in vitro*. Les α - et β -défensines partagent une grande similarité de structure avec un feuillet β central composé de trois brins et stabilisés par des ponts disulfure.

Une troisième sous-famille intéressante a été découverte récemment^{15,16}. Elle regroupe les peptides de la famille des θ -défensines qui demeurent moins étudiées que leurs deux homologues. La première θ -défensine à avoir été identifiée est la θ -défensine rhésus 1 (RTD-1) qui a été isolée de leucocytes obtenus chez le macaque rhésus (*Macaca mulatta*). Elle possède 18 acides aminés et, contrairement aux représentants des deux autres familles de défensines, elle présente un squelette.

I.1.1.1. Biosynthèse et activité biologique

La structure cyclique des θ -défensines matures résulte de la cyclisation et de la liaison de deux peptides de neuf acides aminés codés par deux gènes codant des précurseurs similaires à ceux des α -défensines (Figure 1). Le macaque rhésus possède trois gènes codant des précurseurs de neuf résidus des θ -défensines (appelés A, B et C pour des raisons de simplicité). Chacun de ces peptides peut être associé à son identique (AA, BB et CC) ou à un peptide différent (AB, AC, BC). Ces deux gènes peuvent produire six potentielles θ -défensines rhésus mais seul trois ont été caractérisées (Tableau 1).

Bien que présentes chez de nombreuses espèces de primates, les θ -défensines ne sont pas synthétisées chez l'homme. Au moins six gènes codant un précurseur putatif d'une telle défensine ont pourtant été identifiés dans le génome humain, mais l'insertion d'un codon stop dans la séquence du gène empêche sa synthèse. Cependant, en étudiant les systèmes génétiques des RTD et en modifiant certains de ces gènes humains chez les cellules de la moelle osseuse, il a été possible de produire des θ -défensines appelées rétrocyclines¹⁷.

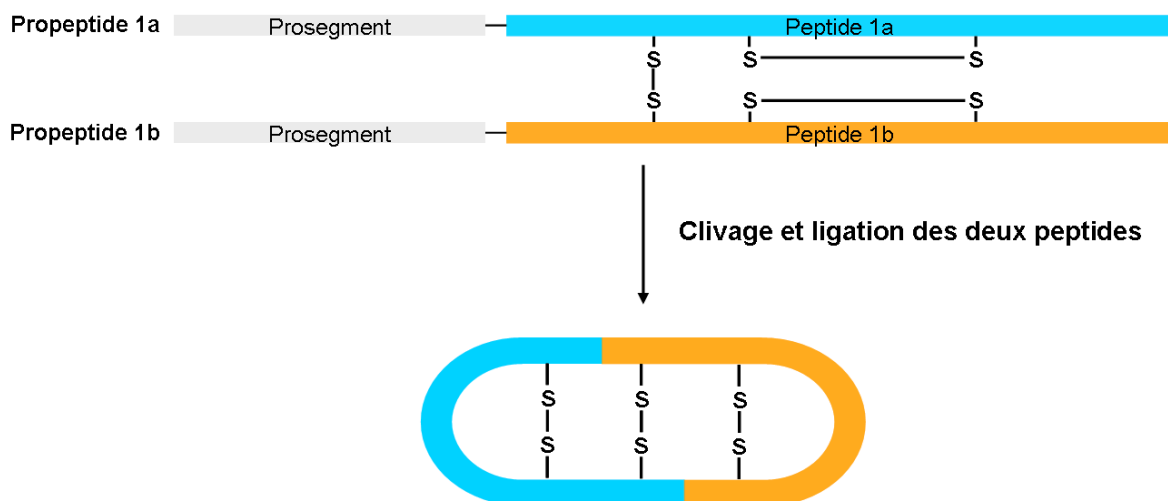


Figure 1 : Schéma de biosynthèse des θ -défensines animales. Les deux gènes impliqués dans la biosynthèse sont exprimés sous la forme de deux propeptides 1a (bleu) et 1b (orange), eux-mêmes constitués chacun d'un prosegment en N-terminal et de la demi-séquence du peptide mature. Ils sont associés entre eux par un pont disulfure. A la suite d'une étape de clivage des prosegments et de ligation des peptides, on obtient le peptide mature cyclique¹⁶.

I.1.1.2. Structures tridimensionnelles et mécanisme d'action

Les structures tridimensionnelles de deux θ -défensines ont été résolues par RMN en solution. Elles consistent en un feuillet β antiparallèle qui s'étend sur la quasi-intégralité de la structure (Figure 2). Constituées de résidus majoritairement hydrophobes, leur longueur correspond exactement à l'épaisseur d'une bicouche lipidique. Des études RMN ont montré que la rétrocycline 2 s'insère de cette manière dans la membrane, sans doute afin de former des pores¹⁸.

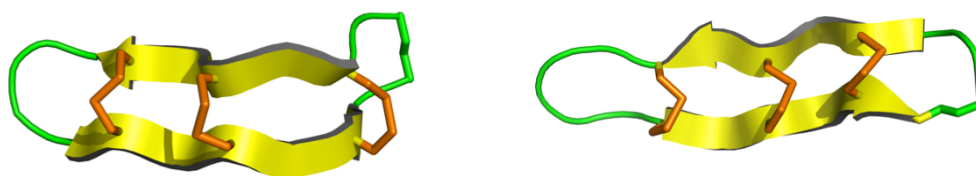


Figure 2 : Structures tridimensionnelles de la θ -défensine rhésus-1 (PDB 1HVZ¹⁹) et de la rétrocycline 2 (PDB 2ATG²⁰).

I.1.1.3. Activités biologiques des défensines circulaires

Alors que la majorité des défensines animales protège l'organisme producteur contre les infections microbiennes, les θ -défensines possèdent une activité antivirale intéressante (Tableau 1).

Tableau 1 : Séquences des θ -défensines isolées et dont l'activité a été étudiée. Les ponts disulfure sont représentés en rouge sur le peptide RTD-1 et leur agencement est identique pour chaque défensine circulaire. Les acides aminés qui varient sont représentés en gras.

Nom	Séquence	Activité
RTD-1	cyclo-G F CRCL L RRGVCRCL T R	Anti-HIV-1
RTD-2	cyclo-G V CRCL L RRGVCRCL R R	Anti-HIV-1
RTD-3	cyclo-G F CRCL T RG F CRCL T R	Anti-HIV-1, anti-HSV
Rétrocycline 1	cyclo-GICRCL I GRGICRCL I GR	Anti-HIV-1
Rétrocycline 2	cyclo-GICRCL I GR R ICRCL I GR	Anti-HIV-1, anti-H5N1, anti-HSV
Rétrocycline 3	cyclo- R ICRCL I GR R ICRCL I GR	Anti-HIV-1

Les RTD présentent une activité dirigée notamment contre le virus d'immunodéficience humaine (HIV). La rétrocycline possède une activité antivirale plus importante que RTD-1, notamment contre le virus HIV-1^{21,22}. L'étude de l'activité de la rétrocycline 2 a montré qu'elle était capable de s'insérer dans des micelles

lipidiques mimant la bicouche lipidique membranaire¹⁸, mais que sa forme active était constituée d'un trimère dont la structure de chaque monomère, déterminée par RMN, était identique à celle du monomère libre²⁰. Ceci suggère une symétrie dans l'assemblage des trois monomères. Les auteurs ont proposé un modèle dans la trimérisation de la rétrocycline 2 qui serait cohérent avec une insertion dans les membranes lipidiques des virus ainsi qu'avec l'existence d'une symétrie d'ordre 3 dans laquelle chaque monomère serait dans le même environnement chimique (Figure 3).

L'interaction des θ -défensines avec la membrane des virus empêcherait l'adhésion entre les membranes cellulaire et virale, et protégerait activement les organismes producteurs contre ce type de virus²³.

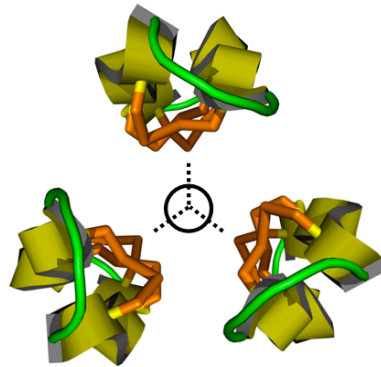


Figure 3 : Trimère de la rétrocycline 2 vu de « dessous ». On remarque ainsi la symétrie d'ordre 3 observée par RMN²⁰.

I.1.2. Cyclotides

Les cyclotides (« cyclo-peptides ») sont des peptides dont la taille est comprise entre 28 et 37 acides aminés qui ont été isolés chez des plantes²⁴. Ils présentent un squelette peptidique cyclisé par une liaison peptidique entre les extrémités N-terminale et C-terminale, et possèdent six résidus cystéines engagés dans des ponts disulfure, qui leur confèrent une structure nouée dont le motif structural est appelé « cyclic cystine knot » (CCK)^{25,26}.

La découverte du premier cyclotide, kalata B1 remonte aux années 1960. Gran isola un peptide de 29 résidus à partir de la plante *Oldenlandia affinis* utilisée en médecine traditionnelle chez des tribus congolaises^{27,28}. Le nom de kalata B1

provient du nom que les indigènes donnaient à leurs pratiques médicales, « kalata-kalata ». La structure tridimensionnelle de ce peptide ne fut résolue qu'en 1995²⁹ et révéla les particularités structurales de cette nouvelle famille de composés. Depuis cette découverte, les mises en évidence de motif CCK se sont accentuées et le nombre de cyclotides qui existeraient dans la biodiversité est évalué aujourd'hui à environ 50 000⁵, principalement dans les familles des rubiacées, des violacées et des cucurbitacées (Figure 4).

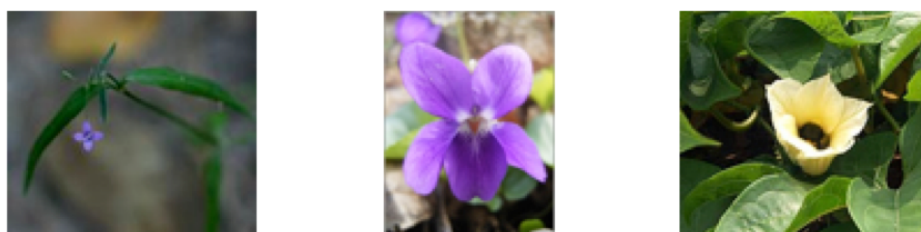


Figure 4 : De gauche à droite, fleurs d'*Oldenlandia affinis* (Rubiaceae), de *Viola odorata* (Violaceae) et de *Momordica cochinchinensis* (Cucurbitaceae), trois plantes productrices de cyclotides.

I.1.2.1. Biosynthèse

Les cyclotides sont synthétisés sous forme d'un pré-propeptide constitué par quatre segments peptidiques (Figure 5). La région N-terminale détermine une zone d'interaction avec le réticulum endoplasmique (ER), la région suivante est une région dite « pro- » puis on trouve une région N-terminale (NTR) suivie de la séquence peptidique du cyclotide proprement dit (ici B1 pour la kalata B1). On sait que le peptide subit une ou plusieurs étapes de clivage puis de maturation (cyclisation et formation des ponts disulfure) mais l'ordre de ces étapes ainsi que les enzymes mises en jeu sont mal connus⁵.

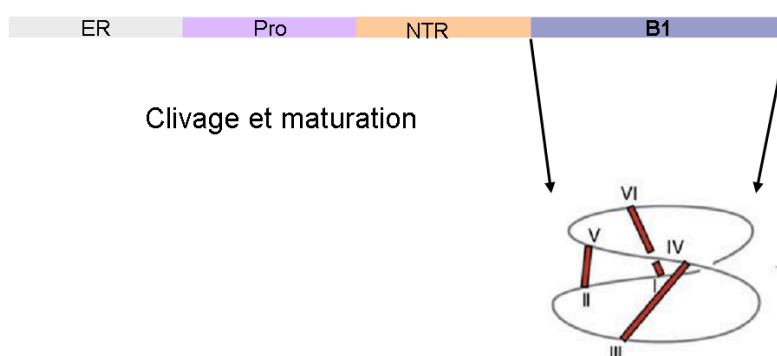


Figure 5 : Biosynthèse de la kalata B1⁶.

I.1.2.2. Diversité structurale

Les structures tridimensionnelles de cyclotides mettent en évidence pour cette famille un macrocycle de 28 à 37 acides aminés, contenant un motif de six cystéines définissant six boucles (notées de 1 à 6) selon la formule $\text{cyclo-C}^I\text{-X}_a\text{-C}^{II}\text{-X}_b\text{-C}^{III}\text{-X}_c\text{-C}^{IV}\text{-X}_d\text{-C}^V\text{-X}_e\text{-C}^{VI}\text{-X}_f$ où les X représentent les acides aminés qui ne sont pas des cystéines ; avec *a* comprenant 3 résidus, *b* de 4 à 8 résidus, *c* de 4 à 7 résidus, *d* un seul résidu, *e* de 4 à 5 résidus et *f* de 6 à 13 résidus (Figure 6). Les cystéines sont liées entre elles selon l'arrangement $\text{Cys}^I\text{-Cys}^{IV}$, $\text{Cys}^{II}\text{-Cys}^V$ et $\text{Cys}^{III}\text{-Cys}^{VI}$. Outre les six cystéines du squelette peptidique, les boucles 1 et 4 sont hautement conservées par leur nombre d'acides aminés ainsi que par la nature des résidus pour la boucle 1, ce qui laisse penser qu'elles sont nécessaires à l'acquisition de la structure CCK.

De plus, certaines positions dans la séquence peptidique des cyclotides semblent être plus tolérantes que d'autres à la nature des acides aminés comme le montre le diagramme de la Figure 6. Ceci laisse supposer que ces peptides peuvent être utilisés dans des expériences de chimérisation de peptides ou de modifications séquentielles afin de leur faire acquérir une autre activité biologique (voir I.1.2.4).

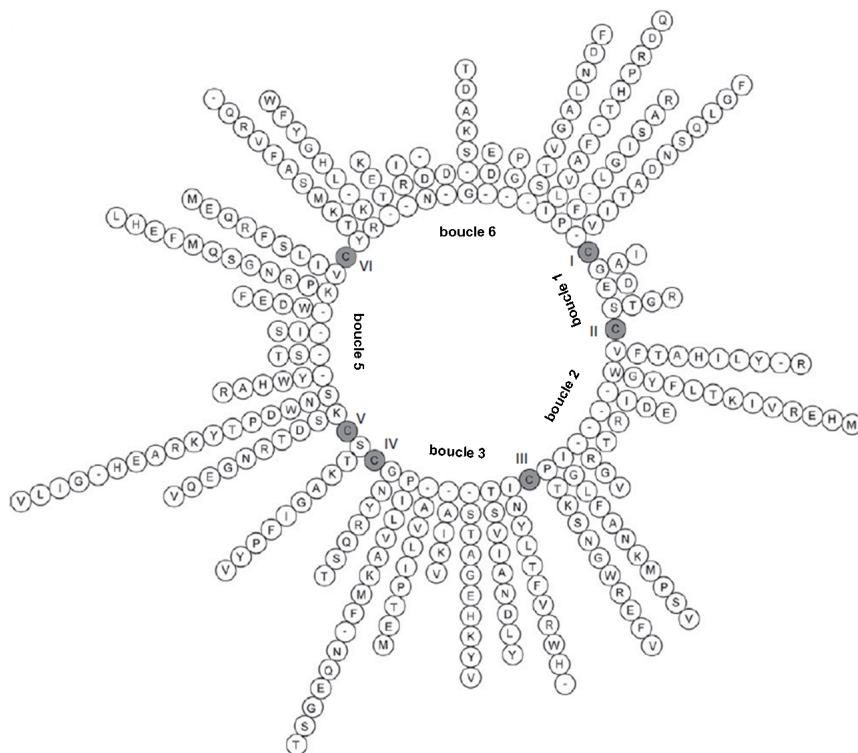


Figure 6 : Diagramme représentant la diversité dans la séquence des cyclotides³⁰.

Les cyclotides ont été classifiés en trois catégories appelées Möbius, bracelet et inhibiteur de trypsine selon l'agencement de leur ponts disulfure et la présence ainsi que la position d'une hélice α dans la séquence (Tableau 2 et Figure 7). A ce jour, 31 entrées de la « Protein data bank » (PDB) concernent des structures de cyclopeptides en solution ou bien en présence de micelles⁶. Elles ont, à l'exception de la structure de varv F qui a été déterminée par cristallographie aux rayons X (RX), toutes été résolues par modélisation moléculaire sous contraintes RMN (voir pour revue Daly *et al.*³¹).

Tableau 2 : Sélection de séquences de cyclotides dont la structure tridimensionnelle a été résolue⁶. Les trois ponts disulfure sont représentés sur la séquence de la kalata B1 et sont identiques pour chaque cyclotide.

Nom	Séquence
Möbius	
Kalata B1 ²⁹	cyclo---GLPVG---ETC-VGGTC---NTPGCTCS---WPVCTR--N
Kalata B2 ³²	cyclo---GLPVG---ETC-FGGTC---NTPGCSCT---WPICTR--D
Kalata B7 ³³	cyclo---GLPVG---ETC-TLGTTC---YTQGTCTCS---WPICKR--N
Varv F ³⁴	cyclo---GVPIG---ETC-TLGTTC---YTAGCSCS---WPVCTR--N
Cycloviolacine O14 ³⁵	cyclo--GSIPAG---ESC-FKGKC---YTPGCSCK--YPLCAK--N
Bracelet	
Kalata B8 ³⁶	cyclo--GSVLNCG---ETC-LLGTTC---YTTGCTCNK--YRVCTK--D
Tricyclone A ³⁷	cyclo-GGTIFDCG---ESC-FLGTTC---YTKGCSCE--WKLCYGT-N
Cycloviolacine O1 ³⁸	cyclo---G-IPCA---ESC-VYIPCTVTALLGCSCK---NRVCY--N
Cycloviolacine O2 ³⁹	cyclo---G-IPCG---ESC-VWIPCTVTALLGCSCK---SKVCYR--N
Vhl-1 ⁴⁰	cyclo---S-ISCG---ESC-AMISFCFTE-VIGCSCK---NKVCYL--N
Vhr1 ⁴¹	cyclo---G-IPCA---ESC-VWIPCTVTALLGCSCK---NKVCY--N
Circuline A ⁴²	cyclo---G-IPCG---ESC-VWIPCTVTALLGCSCK---NKVCYR--N
Circuline B ⁴³	cyclo---GVIPCG---ESC-VFIPCTVTALLGCSCK---NKVCYR--N
Palicouréine ⁴⁴	cyclo--GDPTFCG---ETCRVIPVCTYSAAALGCTCDDRSDGLCKR--N
Inhibiteur de trypsine	
MCoTI-II ⁴⁵	cyclo--GG--VCPKILKKCRDSDC----PGACICRG--NGYCGSGSD

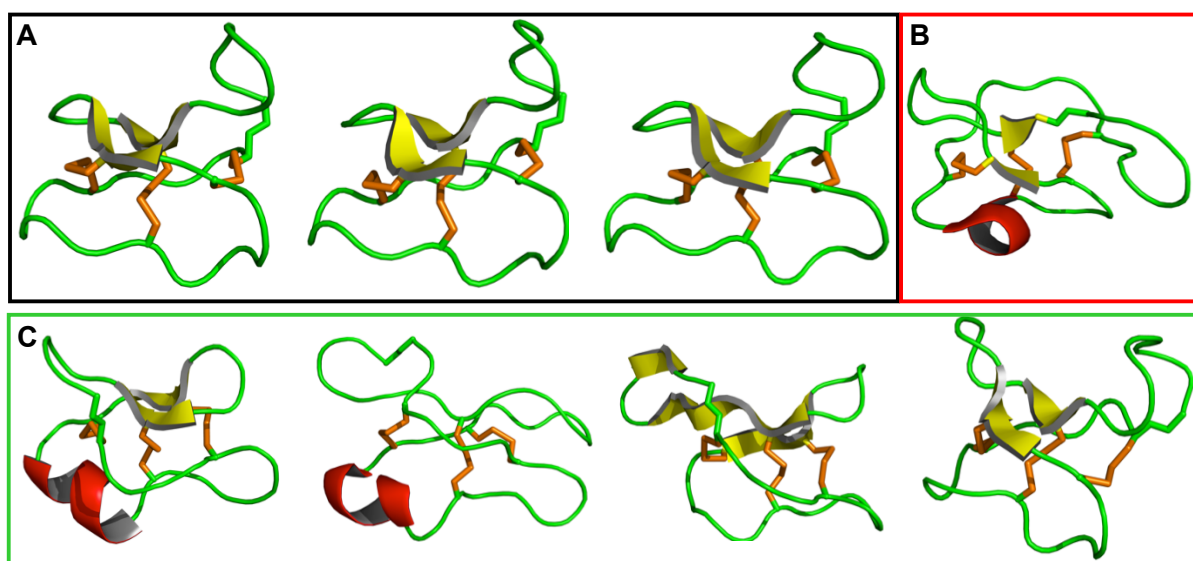


Figure 7 : Sélection de structures tridimensionnelles de cyclotides de type **A) Möbius** (cadre noir) : kalata B1 (PDB 1NB1³⁸), kalata B7 (PDB 2JWM³³) et varv F (PDB 3E4H³⁴) ; **B) inhibiteur de trypsine** (cadre rouge) : MCoTI-II (PDB 1IB9⁴⁵) et **C) bracelet** (cadre vert) : cycloviolacine O1 (PDB 1NBJ³⁸), palicouréine (PDB 1R1F⁴⁴), tricyclone A (PDB 1YP8³⁷) et kalata B8 (PDB 2B38³⁶).

I.1.2.3. Activités biologiques

L'activité biologique des cyclotides s'est avérée être intéressante et montre une forte diversité. La plupart des cyclotides possèdent une activité anti-VIH et hémolytique, avec une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) de l'ordre de 100 nM⁴⁶, sans doute en ciblant la membrane plasmique des cellules infectées par le virus. Malheureusement, il apparaît que la spécificité de ces peptides pour les cellules infectées par rapport aux cellules saines n'est pas assez importante pour qu'ils fassent encore l'objet d'une recherche clinique poussée. De nombreux cyclotides présentent une activité antimicrobienne importante avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 0,2 et 50 μ M et dirigées contre de nombreuses souches bactériennes et fongiques, notamment *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Candida kefyr*⁴⁷. Ces cyclotides s'insèrent dans la membrane cellulaire grâce à leurs résidus hydrophobes plutôt que grâce leur structure tridimensionnelle qui n'apparaît pas jouer un rôle très important dans l'orientation du peptide lors de son insertion dans la membrane³³ (Figure 8). Enfin, étant des molécules synthétisées par des plantes, on s'attend à dégager des activités antiparasitaires contre les organismes dangereux pour les végétaux. Les

cyclotides sont ainsi actifs contre des larves de lépidoptères⁴⁸, des escargots⁴⁹, des nématodes parasites du mouton⁵⁰ et de l'homme⁵¹. Des études par microscopie optique et électronique ont montré que les peptides provoquaient la rupture des membranes cellulaires de l'intestin des larves par un mécanisme similaire à celui responsable de l'activité antibactérienne⁵².

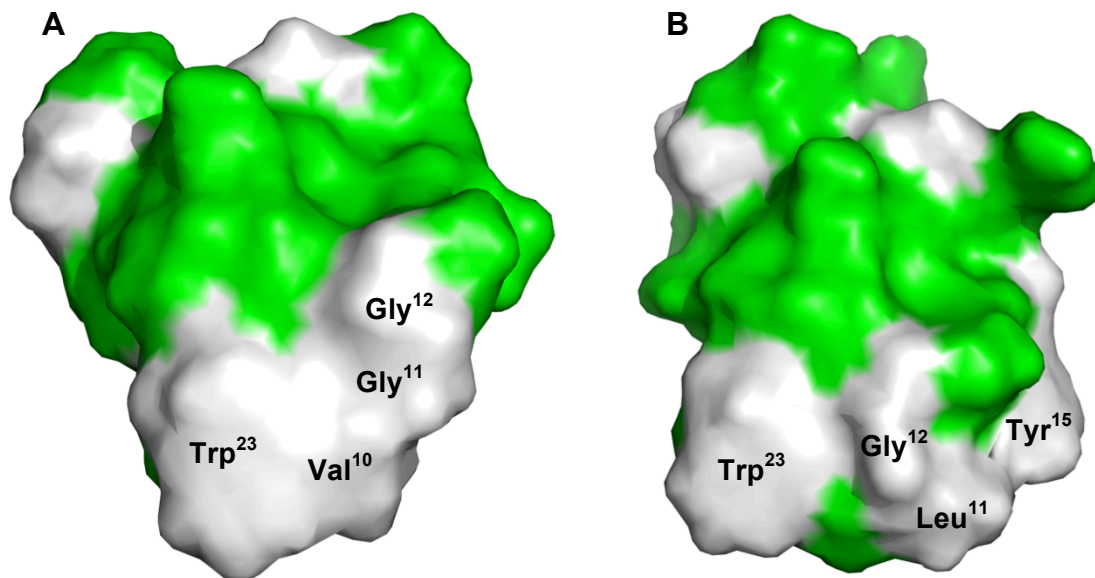


Figure 8 : Représentation des résidus hydrophobes de A) kalata B1 et B) kalata B7. Les résidus non-hydrophobes sont représentés en vert et les résidus formant une région susceptible de s'insérer dans la membrane cellulaire sont explicités³¹.

I.1.2.4. Bioingénierie des cyclotides

La tolérance de certaines positions de la séquence des cyclotides aux substitutions (Figure 6) suggère une application en bioingénierie pour le désign de peptides bioactifs stabilisés par le motif structural CCK. Ainsi, le squelette peptidique des cyclotides a pu être utilisé afin de synthétiser des peptides possédant une activité biologique différente de celle des cyclotides. Le but de ces études est de stabiliser un motif bioactif en utilisant la matrice structurale des cyclotides très résistantes aux dégradations diverses⁵³. Notamment, une équipe a réussi à greffer sur le squelette de la kalata B1 la région linéaire d'une protéine possédant une activité antagoniste du facteur de croissance des vaisseaux sanguins endothéliaux A (VGEF-A), ouvrant la voie à une nouvelle branche de synthèse de molécules bioactives⁵⁴.

I.1.3. Conotoxines

Les conotoxines⁷ font partie de la famille des conopeptides, molécules synthétisées par les coquillages du genre *Conus* (Figure 9). Ces coquillages sont connus pour être de redoutables prédateurs, ils projettent sur leur proie (généralement de petits poissons) un appendice en forme de harpon à travers lequel ils injectent un puissant venin dans le corps du poisson. Ce venin comporte des molécules protéiques, les conopeptides, dont les conotoxines qui s'attaquent aux récepteurs du système nerveux de la victime. Les coquillages du genre *Conus* sont connus depuis longtemps par les communautés humaines de la Méditerranée et du Pacifique, que ce soit pour leur aspect ornemental (comme on peut le voir sur un collier constitué de coquilles de *Conus* daté de 5000 ans, et retrouvé dans une tombe de la vallée du Tigre et de l'Euphrate) ou pour la toxicité de leurs molécules.

Les conopeptides se répartissent en deux familles⁵⁵ : la première comprend les peptides ne possédant pas ou qu'un seul pont disulfure alors que la seconde comprend les peptides riches en ponts disulfure. Les conotoxines, dont la séquence varie entre 12 et 30 acides aminés, fait partie de cette dernière famille.



Figure 9 : De gauche à droite, *Conus geographus*, *Conus imperialis* et *Conus marmoreus*, et *radulae* du mollusque (*C. striatus* et *C. geographus*) lui servant à harponner sa proie et à lui injecter son venin dans le corps.

I.1.3.1. Biosynthèse

La synthèse des conotoxines est composée de trois étapes distinctes⁵⁶. Le peptide est d'abord synthétisé sous la forme d'un pré-propeptide comportant une séquence signal dans sa partie N-terminale, une région pro et la séquence de la toxine mature dans sa partie C-terminale. Ce peptide subit un clivage protéolytique par une carboxypeptidase et des modifications post-traductionnelles grâce à deux

enzymes, une isomérase disulfide et une peptidyl-glycine α -amidase monooxygénase, pour donner le peptide mature et replié (Figure 10).

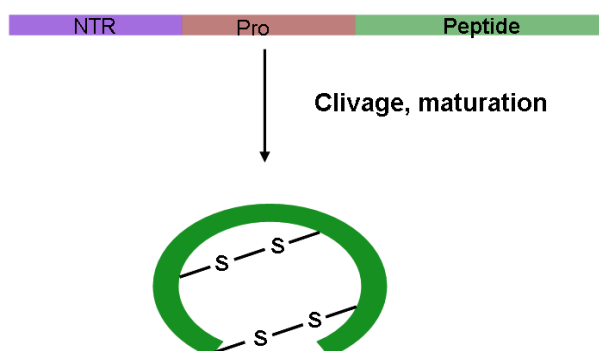


Figure 10 : Biosynthèse des conotoxines⁵⁶.

I.1.3.2. Activités biologiques

Les conotoxines agissent sur le système nerveux de la cible du coquillage, notamment comme antagoniste de récepteurs de ce système. Elles appartiennent à la deuxième classe de conopeptides et sont elles-mêmes classifiées selon le récepteur du système nerveux auquel elles se fixent : nicotinique, sodique, potassique et calcique. Ceux-ci interviennent à différents stades de la genèse d'un potentiel d'action et les conotoxines présentent un mode d'action très similaire sur ces cibles moléculaires. Elles interagiraient de manière compétitive avec le ligand avec la partie extracellulaire du récepteur.

Les α -conotoxines agissent ainsi sur les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChR), les $\alpha\kappa$ -conotoxines sur ces mêmes récepteurs ainsi que sur les récepteurs K^+ , les δ -conotoxines, les μ -conotoxines et les μO -conotoxines se fixent aux récepteurs Na^+ , les κ -conotoxines uniquement aux récepteurs K^+ , et les ω -conotoxines aux récepteurs Ca^{2+} (Tableau 3).

Dans la plupart des cas, un très faible nombre de résidus interviendrait dans la liaison du peptide avec le récepteur. L' α -conotoxine lml est reconnue par les récepteurs nAChR par le biais de son résidu Pro5 nécessaire à son activité⁵⁷. La μ -conotoxine GIIIA nécessite Arg13 afin d'obstruer totalement les récepteurs K^+ ⁵⁸. L' ω -conotoxine MVIIC possède un grand nombre d'acides aminés basiques qui sont connus pour jouer un rôle important dans l'inhibition des canaux Ca^{2+} ⁵⁹, notamment

le résidu Tyr13. Le peptide PVIIA, κ -conotoxine, se fixe au canal K⁺ KcsA grâce au duo formé par Lys7 et Phe9⁶⁰ et présente une activité accrue lorsque le canal se trouve dans son état électro-physiologique « ouvert »⁶¹.

L'activité intéressante de l'ordre du nanomolaire de cette catégorie de toxines sur les canaux du système nerveux en fait un sujet de recherche particulièrement apprécié dans le domaine thérapeutique. Certaines ω -conotoxines sont actuellement en phase de développement clinique comme analgésiques et apparaissent sur le marché comme médicament⁵⁶. Le Ziconotide (Prialt®) est maintenant une alternative importante pour les individus qui ne tolèrent pas les traitements usuels aux opioïdes et aux narcotiques⁶².

Tableau 3 : Exemples de représentants des différentes familles de conotoxines.

Nom	Récepteur-cible	Origine
α-conotoxines		
α -ImI ⁵⁷	nAChR	<i>C. imperialis</i>
α -MII ⁶³	nAChR	<i>C. magus</i>
α -RgIA ⁶⁴	nAChR	<i>C. regius</i>
α -Vc1.1 ⁶⁵	nAChR	<i>C. victoriae</i>
$\alpha\kappa$-conotoxines		
$\alpha\kappa$ -pl14a ⁶⁶	K ⁺ , nAChR	<i>C. planorbis</i>
δ-conotoxines		
δ -TxVIA ⁶⁷	Na ⁺	<i>C. textile</i>
κ-conotoxines		
κ -PVIIA ⁶⁸	K ⁺	<i>C. purpurascens</i>
μ-conotoxines		
μ -GIIIA ⁶⁹	Na ⁺	<i>C. geographus</i>
μ -GIIIB ⁶⁹	Na ⁺	<i>C. geographus</i>
μ -PIIIA ⁷⁰	Na ⁺	<i>C. purpurascens</i>
μO-conotoxines		
μ O-GS ⁷¹	Na ⁺	Synthèse
μ O-MrVIA ⁷²	Na ⁺	<i>C. marmoreus</i>
μ O-MrVIB ⁷²	Na ⁺	<i>C. marmoreus</i>
ω-conotoxines		
ω -GVIA ⁷³	Ca ²⁺	<i>C. geographus</i>
ω -MVIIA ⁷⁴	Ca ²⁺	<i>C. magus</i>
ω -MVIIC ⁷⁵	Ca ²⁺	<i>C. magus</i>

I.1.3.3. Structures tridimensionnelles

La majorité des structures tridimensionnelles des conotoxines ont été résolues par RMN en solution. Ces structures (dont des exemples sont représentés dans la Figure 11) présentent une grande diversité d'arrangements spatiaux. En effet, outre leur grand nombre de ponts disulfure, relativement à leur petite taille, on ne retrouve pas de motifs secondaires typiques de cette famille de peptides.

On peut ainsi remarquer chez ces peptides la présence d'hélices α (notamment chez les α -conotoxines), de feuillets β antiparallèles à deux ou trois brins (δ - et ω -conotoxines) ou bien l'absence totale de structures secondaires (κ -conotoxines).

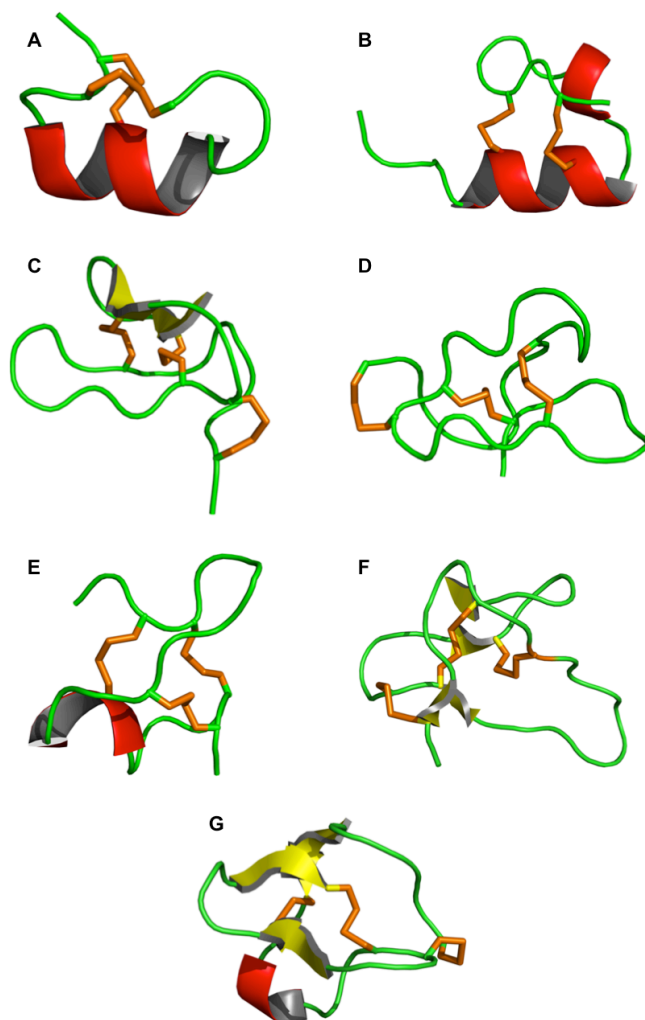


Figure 11 : Structures tridimensionnelles de représentants des différentes familles de conotoxines. **A)** α -conotoxine Vc1.1 (PDB 2H8S⁶⁵) ; **B)** $\alpha\kappa$ -conotoxine pl14a (PDB 2FQC⁶⁶) ; **C)** δ -conotoxine TxVIA (PDB 1FU3⁷⁶) ; **D)** κ -conotoxine PVIIA (PDB 1AV3⁷⁷) ; **E)** μ -conotoxine GIIIB (PDB 1GIB⁷⁸) ; **F)** μ O-conotoxine MrVIB (PDB 1RMK⁷⁹) ; **G)** ω -conotoxine MVIIC (PDB 1OMN⁸⁰).

De manière similaire aux cyclotides, les conotoxines présentent toutes un squelette peptidique caractéristique de leur famille, à la surface duquel affleurent les deux ou trois résidus cruciaux pour l'activité biologique, notamment l'interaction avec le récepteur du système nerveux³¹.

I.1.3.4. Bioingénierie des conotoxines

Grâce à leur potentialité thérapeutique, les conotoxines font l'objet d'études cliniques dans le but d'une mise sur le marché mais aussi d'études de bioingénierie afin d'augmenter leurs activités biologiques. Dans ces recherches, la RMN joue un rôle de premier plan³¹.

Les ω -conotoxines attirent particulièrement l'attention. On a ainsi réussi à produire par synthèse peptidique des ω -conotoxines naturelles ainsi que des analogues. Des études de synthèse chimique ont montré qu'il était possible de reproduire le repliement spatial de ces peptides malgré leur apparente complexité structurale. Ces approches de production de peptides bioactifs par synthèse chimique en se basant sur les substances isolées dans la nature sont prometteurs pour le développement futur de nouveaux médicaments⁵⁶.

I.2. Peptides synthétisés par les procaryotes

I.2.1. Les bactériocines

Les bactériocines sont des peptides ou des protéines antibactériens produits par des bactéries selon la voie ribosomale et comportant ou non des modifications post-traductionnelles⁸¹. Elles comprennent entre 12 et 100 acides aminés et sont très souvent amphiphiles. Outre ces similitudes, elles diffèrent considérablement par leur séquence et par leur structure tridimensionnelle.

Leur biosynthèse fait intervenir un groupe de gènes (« cluster ») particulier pour chaque bactériocine mais possédant des caractéristiques communes. On trouve ainsi un gène codant un précurseur, un gène codant une protéase clivant le précurseur, un gène codant une protéine d'immunité, un ou plusieurs gènes codant des enzymes responsables de modifications post-traductionnelles, un gène codant un ABC-transporteur et un ou plusieurs gènes de régulation. Celui-ci est constitué

d'une partie « leader » N-terminale et de la séquence du « core-peptide ». Le précurseur produit subit plusieurs étapes de maturation dont une étape de clivage protéolytique qui clive la partie « leader » du peptide (Figure 12).

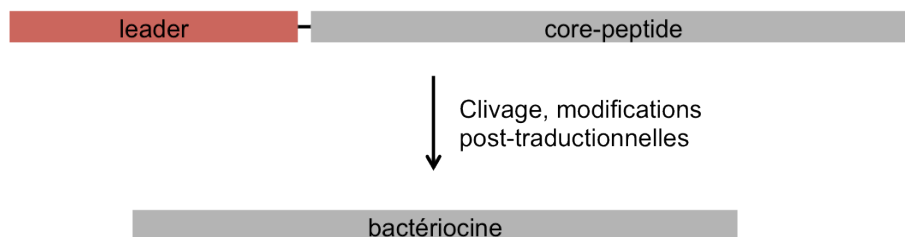


Figure 12 : Schéma général de biosynthèse des bactériocines³ (dont lantibiotiques, bactériocines circulaires et peptides lasso). Le précurseur est constitué d'une partie « leader » et du « core-peptide ». Il subit un clivage de sa partie « leader » et des modifications post-traductionnelles afin de donner la bactériocine mature.

La classification des bactériocines communément utilisée⁸ sépare ces molécules en deux groupes : la classe I regroupe les lantibiotiques présentant de nombreuses modifications post-traductionnelles, et la classe II les bactériocines non-lantibiotiques.

Les bactériocines jouent certainement un rôle écologique important dans l'évolution de la population bactérienne d'un milieu⁸². Bien que ce rôle soit encore mal connu, on peut penser qu'étant actives contre des souches phylogénétiquement proches de la souche productrice, les bactériocines peuvent servir comme anti-compétiteurs en permettant l'invasion par la souche productrice d'une communauté microbienne déjà établie. Au contraire, elles peuvent jouer un rôle de défense et empêcher l'arrivée d'une espèce ou d'une souche dans une niche occupée ou limiter la colonisation par les cellules voisines. Enfin, un dernier rôle proposé consiste à intervenir dans la détection du quorum, c'est-à-dire dans la régulation de l'expression des gènes en réponse aux fluctuations des populations cellulaires. Mais les bactériocines empruntent très certainement chacun de ces rôles au fur et à mesure des changements environnementaux qui affectent le milieu.

Parmi ces molécules trois catégories possèdent une structure compacte intéressante : les **lantibiotiques** et les **bactériocines circulaires** qui sont décrits ici et les **peptides lasso** qui feront l'objet du paragraphe II (voir p.29).

I.2.2. Bactériocines à structure compacte

I.2.2.1. Lantibiotiques

Les lantibiotiques (« lanthionine-containing antibiotics »^{83–85}) sont des peptides antimicrobiens possédant de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ils sont produits par des bactéries à Gram positif et sont étudiés activement depuis la découverte de la nisine en 1927 chez *Lactococcus lactis*⁸⁶. Cette famille de peptides a rapidement attiré l'attention pour ses caractéristiques biochimiques, génétiques, fonctionnelles et structurales très particulières ainsi que pour son potentiel dans la bio-ingénierie de structures peptidiques uniques.

I.2.2.1.1. Biosynthèse

Les lantibiotiques possèdent entre 19 et 38 acides aminés et comportent des résidus déshydratés et des cycles thioéther de type lanthionine (Lan) et 3-méthyllanthionine (MeLan). Ces cycles proviennent de l'addition post-traductionnelle d'une cystéine sur une sérine déshydratée (2,3-didéhydroalanine, Dha) ou sur une thréonine déshydratée ((Z)-2,3-didéhydrobutyrine, Dhb) (Figure 13). Outre ces principales modifications, on a identifié pas moins de 15 modifications post-traductionnelles différentes, dont certaines inconnues jusque-là⁸⁵.

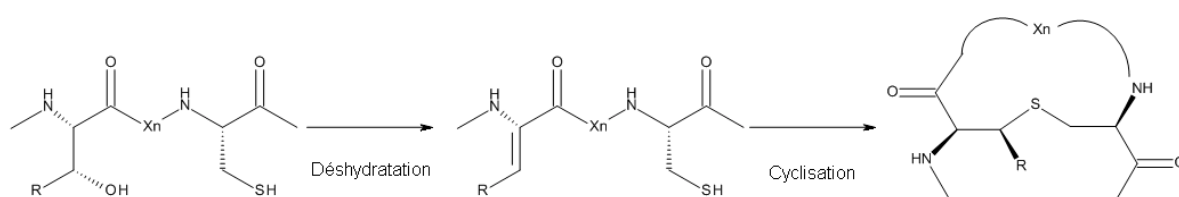


Figure 13 : Mécanisme de formation des cycles lanthionine (R = H) et méthyllanthionine (R = Me). La première étape consiste en la déshydratation d'un groupement alcool d'une sérine (R = H) ou d'une thréonine (R = Me), puis la cyclisation a lieu entre le soufre d'une cystéine distante de n résidus (X_n) et la double liaison formée⁸⁵.

La biosynthèse des lantibiotiques (voir Figure 14 pour celle de la nisine A) fait intervenir trois étapes : la synthèse d'un précurseur, comportant une région « leader » suivie du « core-peptide », la maturation du peptide (déshydratation des résidus Ser et Thr, cyclisation, clivage de la partie « leader ») et l'export du peptide modifié dans le milieu extracellulaire. Les lantibiotiques possèdent un système

génétique d'organisation commune, composé de 5 gènes ou types de gène. Ces gènes (et les protéines qu'ils codent) sont nommés de manière générique *lanX* (LanX pour une protéine) dans la suite du paragraphe. Pour le cas de la nisine A (voir Figure 14), nous avons employé les notations *nisX* et NisX.

Le gène *lanA* code le précurseur qui subira une série de modifications post-traductionnelles par l'action conjuguée des enzymes LanB et LanC ou par l'intervention d'une seule enzyme LanM, codées respectivement par les gènes *lanB*, *lanC* et *lanM*. La première modification subie par le précurseur consiste en la déshydratation de résidus Ser et Thr dans sa partie C-terminale. La synthèse *in vitro* de lantibiotiques utilisant une enzyme de type LanM a montré que les acides aminés Ser et Thr sont d'abord phosphorylés avant de participer à la réaction, puis de subir l'élimination du phosphate⁸⁷. Ce processus en deux étapes a ensuite été démontré *in vivo*⁸⁸. Les enzymes LanB et LanM ne libèrent pas leur substrat avant que l'ensemble des résidus concernés du peptide ne soient déshydratés⁸⁹ et nécessitent la partie « leader » du précurseur afin d'être efficaces⁹⁰. La séquence « leader » est une région que l'on retrouve dans la grande majorité des précurseurs des RiPPs, et son importance dans les étapes de maturation du peptide est cruciale⁹¹. L'enzyme LanC ainsi que la partie C-terminale de l'enzyme LanM, qui présentent de nombreuses homologues, possèdent un site de liaison au précurseur, au zinc et à l'eau⁹² et jouent le rôle de cyclases qui clivent la partie « leader » du précurseur et cyclisent le peptide à différents endroits de la chaîne peptidique. Dans certains cas, comme celui de la nisine A, une protéase spécifique unique (NisP) clive la partie « leader ». Une fois le peptide cyclisé, il est exporté dans le milieu extracellulaire par un transporteur LanT codé par le gène *lanT*. Afin de prémunir la bactérie productrice contre son propre lantibiotique, on trouve un gène d'immunité *lanI* codant une protéine d'immunité spécifique au mécanisme d'action du lantibiotique concerné^{93,94}.

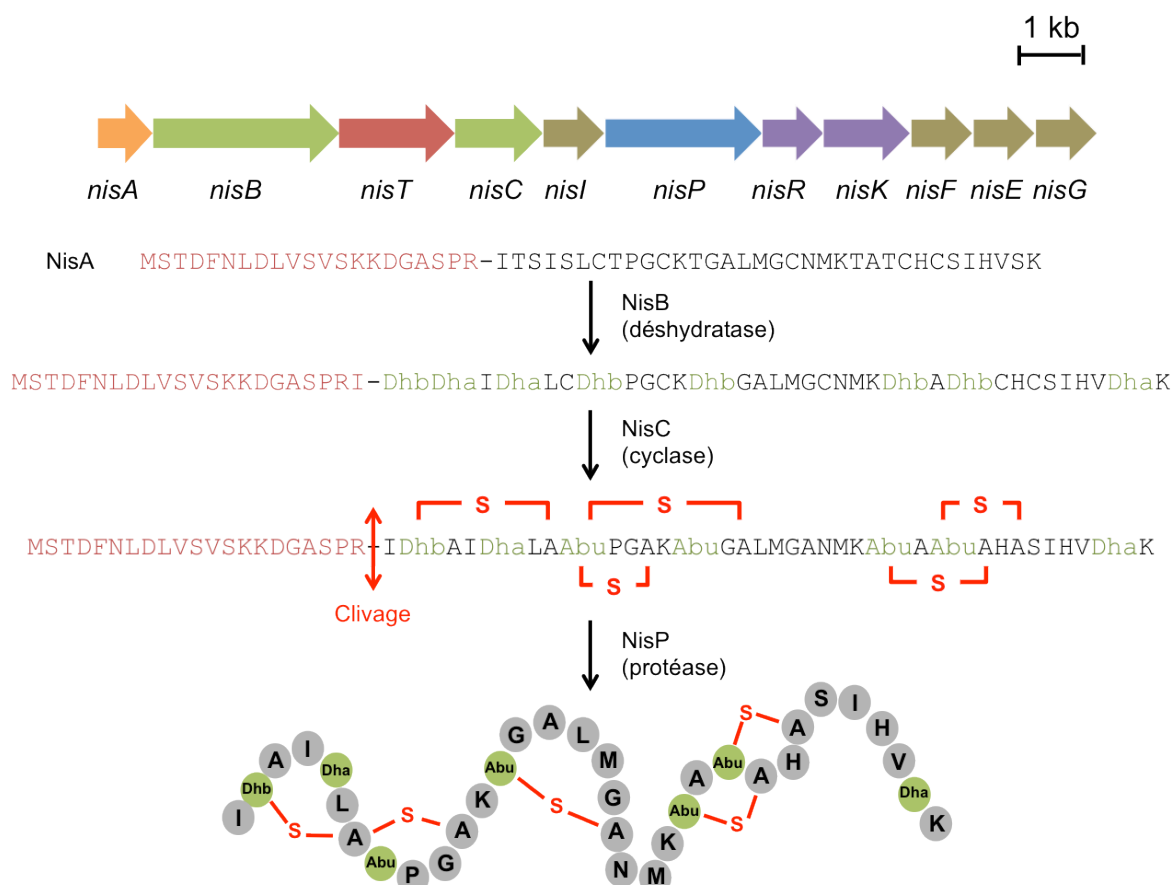


Figure 14 : Mécanisme de biosynthèse de la nisine A. Le gène *nisA* code un précurseur NisA composé d'une région « leader » et du « core-peptide ». L'action successive des enzymes NisB (déshydratation des résidus Ser et Thr), NisC (cyclisation du peptide par formation de ponts thioéther) et NisP (protéase clivant le précurseur entre la région « leader » et le « core-peptide ») aboutit au peptide mature⁸⁵. Le gène *nisT* code un ABC-transporteur, les gènes *nisl*, *nisF*, *nisE* et *nisG* codent des protéines responsables de l'immunité de la cellule productrice, et les gènes *nisK* et *nisR* codent un système de régulation comprenant une kinase et un régulateur de réponse.

1.2.2.1.2. Diversité

Les lantibiotiques sont classifiés en trois sous-familles selon leur mécanisme de biosynthèse ou leur activité⁸⁵ : les peptides de classe I sont modifiés par une déshydratase (LanB) et une cyclase (LanC) séparées, les peptides de classe II sont modifiés par une seule enzyme LanM qui assure ces deux fonctions et les peptides de classe III n'ont pas ou peu d'activité antibiotique mais possèdent d'autres fonctions physiologiques (Tableau 4). Par ailleurs, nous n'évoquons ici que les lantibiotiques agissant sous la forme d'un seul peptide. Il existe aussi une dernière catégorie de lantibiotiques, appelée « two-peptide lantibiotics », dont ses composés sont produits sous la forme de deux peptides et dans laquelle l'activité antimicrobienne du peptide est augmentée par un phénomène de synergie quand les

deux peptides se trouvent en présence l'un de l'autre.

Tableau 4 : Exemples de représentants des trois classes de lantibiotiques.

Nom	Souche productrice
Classe I	
Nisine A ⁹⁵	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454
Subtiline ⁹⁶	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633
Epidermine ⁹⁷	<i>Staphylococcus epidermis</i> Tu3298
Pep5 ⁹⁸	<i>Staphylococcus epidermis</i> 5
Classe II	
Cinnamycine ⁹⁹	<i>Sterptomyces cinnamoneus</i>
Lacticine 481 ¹⁰⁰	<i>Lactococcus lactis</i> CNRZ 481
Mersacidine ¹⁰¹	<i>Bacillus</i> sp. strain HIL Y-85 54728
Lactocine S ¹⁰²	<i>Lactobacillus sakei</i> L45
Sublancine ¹⁰³	<i>Bacillus subtilis</i> 168
Lacticine A1 ¹⁰⁴	3147 <i>Lactococcus lactis</i> DPC3147
Lacticine A2 ¹⁰⁴	3147 <i>Lactococcus lactis</i> DPC3147
Haloduracine α ¹⁰⁵	<i>Bacillus halodurans</i> C-125
Haloduracine β ¹⁰⁵	<i>Bacillus halodurans</i> C-125
Classe III	
SapB ¹⁰⁶	<i>Streptomyces coelicolor</i>
SapT ¹⁰⁷	<i>Streptomyces tendae</i>

I.2.2.1.3. Structures tridimensionnelles

Par ailleurs, les lantibiotiques se distinguent aussi par leur aspect structural. Les peptides de classe I sont formés d'une chaîne peptidique dite étendue dans laquelle les ponts thioéther sont formés entre résidus relativement proches dans la séquence. Les boucles formées sont donc petites, elles ne concernent que 7 acides aminés au maximum. Le peptide conserve donc une structure « linéaire ». Les lantibiotiques de classe II présentent au contraire des structures plus compactes, avec des boucles faisant intervenir de 4 à 16 résidus, ce qui leur confère une structure globulaire (Figure 15).

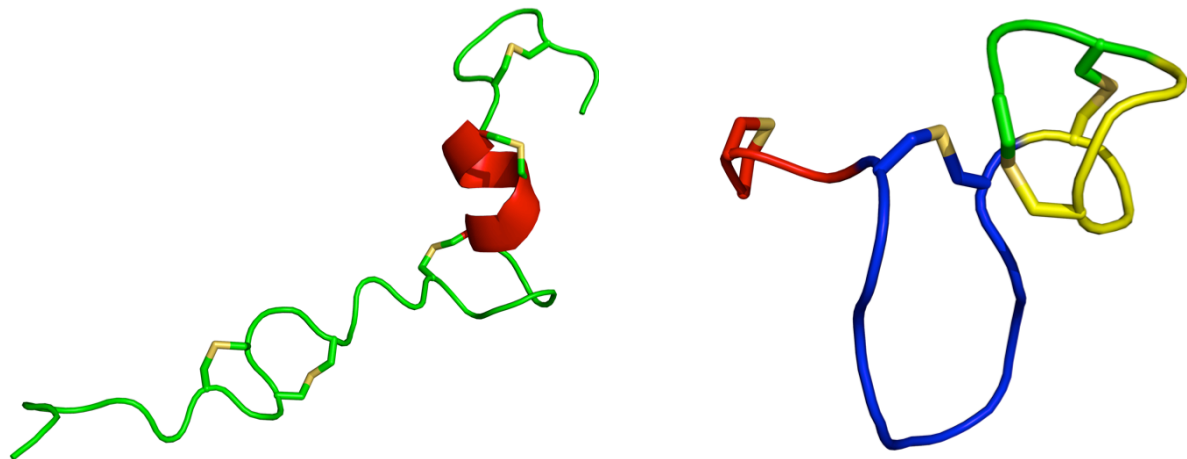


Figure 15 : Structures de la nisine A (PDB 1WCO¹⁰⁸) et de la mersacidine (PDB 1MQX¹⁰⁹). Les quatre cycles de la mersacidine sont représentés dans des couleurs différentes.

1.2.2.1.4. Activités biologiques

Les lantibiotiques sont des molécules antimicrobiennes dont le mode d'action diffère selon les peptides. Les peptides de classe I sont connus pour avoir un mode d'action identique à celui de la nisine A (Figure 16). Celle-ci se lie aux lipides II présents dans la membrane cellulaire de la bactérie et s'insère perpendiculairement à la couche bilipidique en formant des pores constitués de 8 nisines et 4 molécules de lipides II^{110–112}. La nisine agit aussi selon un mécanisme alternatif en séquestrant les lipides II et en les isolant des sites de biosynthèse de la paroi bactérienne¹¹³.

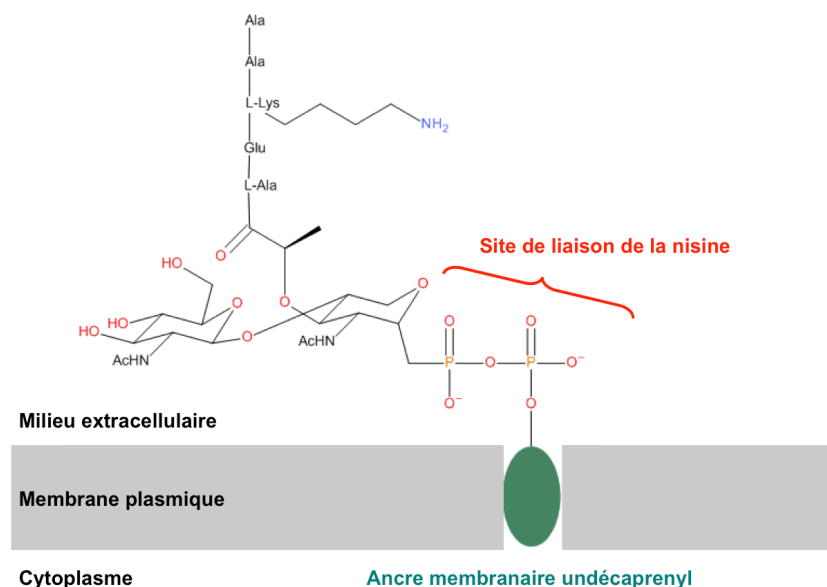


Figure 16 : Site de liaison de la nisine au lipide II de la membrane plasmique. La nisine se lie au lipide II de la membrane (gris) au niveau du pont phosphodiester établi entre l'ancre membranaire undécaprenyl (vert) et le reste de la chaîne du lipide. Une fois liée, elle s'insère dans la membrane pour former des pores transmembranaires (8 molécules de nisine + 4 molécules de lipide) ou elle séquestre les lipides II, ce qui empêche la synthèse de la paroi bactérienne^{111,113}.

Les lantibiotiques de classe II présentent des modes d'action différents bien qu'ils agissent tous sur la membrane cellulaire de la bactérie-cible : la lacticine 481 forme des pores membranaires¹¹⁴, la mersacidine inhibe la transglycosylation dans la biosynthèse des peptidoglycanes¹¹⁵, alors que la cinnamycine et les duramycines se lient à la phosphatidyléthanolamine et introduisent des mouvements de lipides à travers la bicouche¹¹⁶.

Les lantibiotiques de classe III ne possèdent pas d'activité antimicrobienne significative mais jouent un rôle différent pour la cellule productrice⁸⁵. Les trois peptides appartenant à cette catégorie sont produits par trois espèces de *Streptomyces*. SapB est produit par *S. coelicolor*¹⁰⁶, SapT par *S. tendae*¹⁰⁷ et AmfS par *S. griseus*¹¹⁷. Ces lantibiotiques possèdent une structure dans laquelle les résidus amphiphiles et hydrophobes sont très conservés. Ils sont présentés comme pouvant jouer le rôle de surfactants au niveau de la paroi bactérienne bien qu'on ne sache pas encore précisément pour quelle fonction précise¹¹⁸.

I.2.2.2. Bactériocines circulaires^{119,120}

I.2.2.2.1. Biosynthèse

La biosynthèse des bactériocines circulaires fait intervenir un grand nombre de gènes regroupés dans un cluster dont l'expression est sous le contrôle d'un ou plusieurs promoteurs¹²¹. Un gène code un précurseur composé de la séquence de la future bactériocine (« core-peptide ») et d'une séquence « leader » en partie N-terminale. Plusieurs gènes sont ensuite impliqués dans la maturation du peptide, dont l'élimination de la partie « leader » et la cyclisation tête-queue de la bactériocine. Deux ou trois gènes codent les enzymes des transporteurs de type « ATP-binding cassette » (ABC) responsables de l'excrétion du peptide. Enfin, entre un et cinq gènes selon le système génétique semblent intervenir dans l'immunité de la cellule productrice à l'égard de sa propre production.

Le précurseur subit une étape de clivage protéolytique qui excise la partie N-terminale, ce qui aboutit au « core-peptide ». Une liaison peptidique est établie entre les extrémités N- et C-terminales de celui-ci, formant ainsi le peptide mature cyclisé (Figure 17).

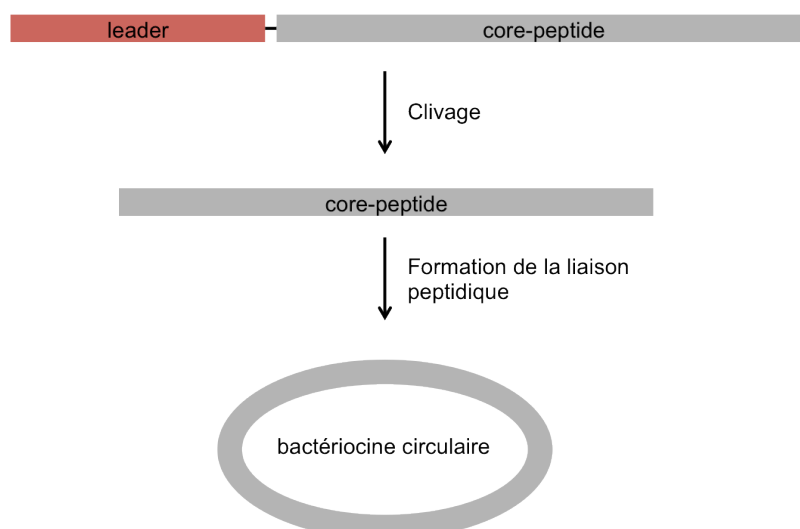


Figure 17 : Schéma de synthèse des bactériocines circulaires. Le précurseur, constitué d'une partie « leader » et du « core-peptide », subit un clivage protéolytique afin de donner le « core-peptide » qui est cyclisé par liaison peptidique de ses extrémités¹²¹.

1.2.2.2.2. Origine et structures tridimensionnelles

Les tailles des bactériocines circulaires varient entre 35 (subtilosine A) et 78 (ubérolysine A) acides aminés (Tableau 5). La seule différence entre ces molécules et les autres bactériocines linéaires conventionnelles vient de leur structure circulaire dont les quelques structures résolues à ce jour (Figure 18) révèlent un repliement avec des motifs en hélice α répétés régulièrement le long de la structure secondaire mais sans autre modification post-traductionnelle de leur séquence.

Tableau 5 : Nom et origine des bactériocines circulaires connues à ce jour.

Nom	Taille	Souche productrice
Entéroicine AS-48 ¹²²	70 aa	<i>Enterococcus faecalis</i> sp. <i>liquefaliensis</i> S-48
Gasséricine A ¹²³	58 aa	<i>Lactobacillus gasseri</i> LA39
Reutéricine 6 ¹²⁴	58 aa	<i>Lactobacillus reuteri</i> LA6
Acidocine B ¹²⁵	59 aa	<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46
Butyrivibriocine AR10 ¹²⁶	35 aa	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> AR10
Ubérolysine ¹²⁷	70 aa	<i>Streptococcus uberis</i> 42
Circularine A ¹¹⁹	69 aa	<i>Clostridium beijerinckii</i>
Subtilosine A ¹²⁸	35 aa	<i>Bacillus subtilis</i>
Carnocycline A ¹²⁹	60 aa	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> UAL307
Lactocycline Q ¹³⁰	61 aa	<i>Lactococcus</i> sp. souche QU12

Une hypothèse pour l'acquisition de cette structure cyclique particulière peut être avancée concernant une augmentation de l'activité antimicrobienne de ces

peptides. En effet, la liaison entre les extrémités N- et C-terminales de la séquence peptidique diminue l'entropie conformationnelle de la chaîne polypeptidique linéaire désordonnée et hautement flexible, ce qui bloque la molécule dans sa conformation bioactive, en plus de la rendre plus résistante à la protéolyse enzymatique, en augmentant sa compacité et en masquant les sites de clivage aux exopeptidases.

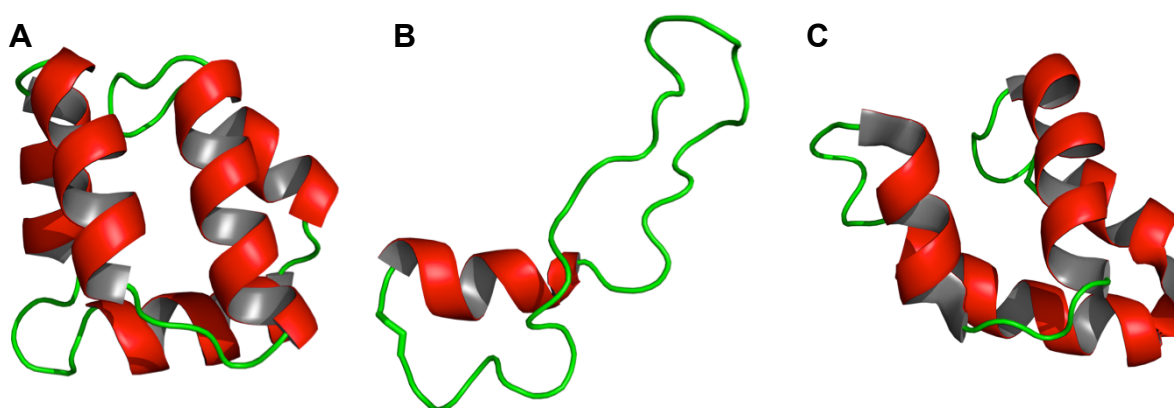


Figure 18 : Structures tridimensionnelles de trois bactériocines circulaires. A) Entérocline AS-48 (PDB 1E68¹²²) ; **B)** subtilosine A (PDB 1PXQ¹²⁸) ; **C)** carnocycline A (PDB 2KJF¹³¹).

1.2.2.2.3. Activités biologiques et rôles écologiques

Du fait de leur large spectre d'activité antimicrobienne (dirigée contre des bactéries à Gram positif, négatif et des levures) et de leur stabilité qui recouvre une grande gamme de pH et de température, les bactériocines circulaires sont très étudiées comme alternatives potentielles aux antibiotiques usuels. Leur mode d'action est très similaire à celui des autres bactériocines et fait intervenir les résidus hydrophobes du peptide qui interagissent avec la membrane de la cellule-cible. Active sous forme de dimère, l'entérocline AS-48 s'insère dans la membrane cytoplasmique de manière indépendante de la différence de potentiel mais induit une perméabilité aux ions accompagnée d'une chute du potentiel transmembranaire¹³². L'interaction de la bactériocine avec la membrane des bactéries chargée négativement ainsi que la formation de pores transmembranaires nécessitent néanmoins une répartition des résidus selon leur hydrophobie et leur charge afin d'établir une surface homogène. Les résidus des hélices α semblent jouer un rôle important dans ce mode d'action. L'insertion à l'intérieur de la membrane cytoplasmique apparaît être assurée par les hélices α au cours d'une réorganisation

structurale du peptide (Figure 19).

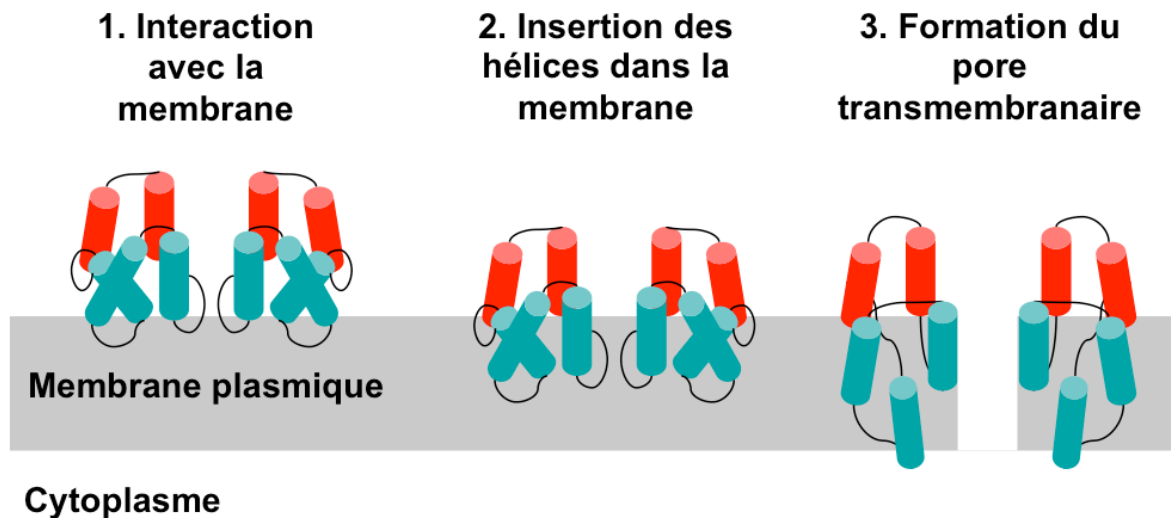


Figure 19 : Mécanisme d'action de l'entéroccine AS-48. Les cinq hélices de la bactériocine sont représentées selon qu'elles s'insèrent dans la membrane (en vert) ou qu'elles restent à la surface de la bicouche lipidique (en rouge)¹³².

Les autres bactériocines circulaires possèdent un mode d'action similaire à l'entéroccine AS-48 et nombre de leurs résidus présentent un caractère hydrophobe dans leurs structures secondaires, ce qui est cohérent avec la formation de pores membranaires. Les bactériocines circulaires sont notamment actives contre un bon nombre de bactéries à Gram positif dont certaines sont pathogènes comme des bactéries des genres *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*.

II. Les peptides lasso

II.1. Découverte des peptides lasso

Une catégorie de peptides compacts est particulièrement originale car elle possède une topologie dite « en lasso » consistant en un nœud moléculaire particulier. Les peptides lasso comportent un cycle macrolactame formé par les 8 ou 9 résidus de la partie N-terminale à l'intérieur duquel est enchâssée la partie C-terminale. Le cycle est constitué par une liaison lactame établie entre le résidu Gly ou Cys N-terminal et le carboxylate de la chaîne latérale d'un résidu Asp ou Glu^{10,133}.

Les peptides lasso sont produits par deux groupes d'eubactéries

environnementales : les actinobactéries et les protéobactéries. Le premier peptide de cette famille caractérisé a été l'**anantine**¹³⁴ isolée de *Streptomyces coeruleus*. Le onzième, et dernier à ce jour, a été isolé de *Asticcacaulis excentricus* en 2012 et baptisé **astexine-1**¹³⁵. On peut noter la grande représentation des espèces de *Streptomyces* dans la liste des bactéries productrices de peptides lasso (Tableau 6, p. 32).

La découverte des peptides lasso est intimement liée à celle de molécules naturelles possédant des activités biologiques d'intérêt thérapeutique. L'anantine a ainsi été découverte suite à un criblage d'activité de centaines de molécules antagonistes du récepteur du facteur natriurétique auriculaire¹³⁴ (ANF, une hormone peptidique synthétisée par l'oreillette droite du cœur). La **microcine J25** (MccJ25), découverte un an plus tard¹³⁶, a été identifiée dans le cadre de recherches portant sur les microcines, peptides antimicrobiens produits par des entérobactéries et notamment par des souches d'*E. coli*⁹. Le peptide **RP-71955**, aussi appelé aborycine, a quant à lui été découvert lors d'un criblage d'activité de molécules inhibant deux protéases impliquées dans le mode d'action du virus d'immunodéficience humaine¹³⁷ (HIV-1) et a fait l'objet d'un brevet, alors même que sa structure et son mode d'action n'étaient pas encore résolus¹³⁸. Les **siamycines** ainsi que les peptides **RES-701-1** et **RES-701-3** ont été détectés dans une recherche systématique de produits bioactifs^{139–141}. Enfin, la **propeptine** a été isolée dans le cadre d'un screening d'activité inhibitrice de la prolyl-endopeptidase (PEP) dont l'activité chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer est plus importante que dans le reste de la population¹⁴².

Ces premiers peptides lasso ont tous été analysés dans le but de trouver des molécules bioactives mais la résolution de la structure lasso chez MccJ25^{143–147} a relancé l'intérêt de la communauté scientifique pour ces peptides. La découverte de cette structure originale, bien que déjà résolue pour RP-71955, la siamycine I et RES-701-1^{148–150}, associée à leurs activités intéressantes a initié une nouvelle phase dans l'étude des peptides lasso.

Le peptide **BI-32169**, qui a d'abord été décrit comme un peptide bicyclique¹⁵¹, a été découvert sept ans plus tard que la propeptine et n'a été décrit comme étant en lasso que plus tard¹⁵². A la suite de la résolution de la structure de MccJ25 et de BI-32169, les **lariatines A** et **B**¹⁵³, la **capistruine**¹⁵⁴ ainsi que

l'astexine-1¹³⁵ ont été les derniers peptides de cette catégorie isolés jusqu'à présent et décrits comme lasso. La découverte de la capistruine et de l'astexine-1 s'est basée sur une technique d'exploration de génomes *in silico* (« genome mining ») novatrice qui permet de franchir une nouvelle étape dans la découverte de ces peptides originaux. Associée à la spectrométrie de masse (MS), cette méthode a permis de prédire et de détecter de nouveaux peptides lasso chez *Streptomyces*, les peptides **SSV-2083** et **SRO15-2005**, mais qui n'ont pas été isolés, ni caractérisés structuralement¹⁵⁵.

Malgré une caractéristique structurale commune, à savoir la présence d'un cycle macrolactame et l'insertion de la partie C-terminale dedans, les peptides lasso présentent certaines différences structurales. La plus importante porte sur le nombre de ponts disulfure dont est doté chaque peptide et qui permet d'établir une classification. Les peptides lasso de **classe I** possèdent deux ponts disulfure, entre Cys1 et Cys13 d'une part et Cys7 et Cys19 d'autre part, les peptides de **classe II** n'en possèdent aucun et le peptide de **classe III** n'en possède qu'un seul (Tableau 6).

II.2. La microcine J25, peptide lasso modèle

La **microcine J25** (MccJ25) est actuellement le peptide lasso le plus étudié durant la dernière décennie et le mieux connu. Un certain nombre d'études se sont penchées sur sa biosynthèse, que ce soit sur ses déterminants génétiques ou sur ses aspects biomoléculaires, mais aussi sur les rapports entre sa structure et son activité biologique^{156,157}.

Isolé très majoritairement du milieu extracellulaire de la culture bactérienne, ce peptide possède une activité antibactérienne sur des souches phylogénétiquement proches de la cellule productrice, telles des *Salmonella* et des *Escherichia*¹³⁶, pouvant apporter un bénéfice à l'organisme-hôte^{158,159}.

II.2.1. Etude de la biosynthèse et de la sécrétion de MccJ25

II.2.1.1. Détermination du système génétique de MccJ25

MccJ25 est originellement isolée de la souche *Escherichia coli* AY25 et

Nom	Séquence	Activité biologique	Bactéries productrices	Méthode	Facteurs stabilisant
Classe I					
MS-271 (Siamycine I)		Antibactériens Anti-VIH et anti-HSV	<i>Streptomyces</i> sp. M-271 ^{160–162}	RMN ¹⁶³	Ponts disulfure
Siamycine II		Inhibiteurs de		-	-
RP-71955 (Aborycine)		l'aspartyl-protéase, de la MLCK	<i>Streptomyces</i> sp. SP9440 ^{137,138}	RMN ¹⁴⁸	Ponts disulfure
SSV-2083		?	<i>Streptomyces sviceus</i> ATCC 29083 ¹⁵⁵	-	-
Classe II					
Lariatine A	GSQLVYREWVGHSNVIKP	Anti-mycobactériens	<i>Rhodococcus</i> sp. K01- B0171 ^{153,164}	RMN ¹⁵³	Mobilité de la partie C-terminale
Lariatine B	GSQLVYREWVGHSNVIKPP		-	-	
Anantine	GFIGWGNDIFGHYSGDF	Antagoniste du récepteur de l'ANF	<i>Streptomyces coerulescens</i> ¹³⁴	-	-
Propeptine	GYPWWDYRDLFGGHTFISP	Inhibiteur de la PEP	<i>Microbispora</i> sp. SNA-115 ¹⁴²	-	-
RES-701-1	GNWHGTAPDWFFNYYW	Antagoniste du récepteur ET _B	<i>Streptomyces</i> sp. RE-701 ¹⁴⁰	RMN ¹⁵⁰	Tyr14 et Tyr15 autour du cycle
RES-701-3	GNWHGTSPDWFFNYYW	Antagoniste du récepteur ET _B	<i>Streptomyces</i> sp. RE-701 ¹⁴¹	-	
Capistruine	GTPGFQTPDARVISRFGFN	Antibactérien (Inhibiteur de l'ARNpol)	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264 ¹⁵⁴	RMN ¹⁵⁴	Arg15 sous le cycle
Astexine-1	GLSQGVEPDIGQTYFEESRINQD	Antibactérien	<i>Asticcacaulis excentricus</i> ¹³⁵	RMN ¹³⁵	Arg19 sous le cycle
MccJ25	GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	Antibactérien (Inhibiteur de l'ARNpol)	<i>Escherichia coli</i> AY25 ¹³⁶	RMN ^{145–147}	Phe19 et Tyr20 autour du cycle
SRO15-2005	GYFVGSYKEYWSRRII	?	<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998 ¹⁵⁵	-	-
Classe III					
BI-32169		Antagoniste du récepteur du glucagon	<i>Streptomyces</i> sp. (DSM 14996) ¹⁵¹	RMN ¹⁵¹ RX ¹⁵²	Pont disulfure

active contre des souches phylogénétiquement proches. AY25 présente donc une immunité pour sa production de peptide antimicrobien mais aussi une résistance contre l'ampicilline. C'est à partir de ces deux résistances à des molécules antibiotiques que l'on a pu montrer que MccJ25 était codée par un « cluster » de gènes situé sur un plasmide d'environ 60 kb nommé pTUC100, qui a pu être utilisé pour transformer la souche MC4100, elle-même utilisée dans les différentes études pour produire MccJ25^{136,165}. L'étude de ce plasmide a révélé l'existence de quatre phases ouvertes de lecture (ORF) situées sur une région de 5,2 kb qui confère à la souche productrice sa résistance au peptide. Ce fragment d'ADN comprend l'ensemble du matériel génétique nécessaire à la production de MccJ25 dont les quatre gènes constituant le système génétique du peptide lasso. Le gène *mcjA* code un précurseur de 58 acides aminés, *mcjB* et *mcjC* codent des enzymes de 208 et 513 acides aminés nécessaires à la maturation du peptide et le gène *mcjD* code un transporteur de 580 acides aminés responsable de l'export et de l'immunité de la bactérie¹⁶⁶ (Figure 20).

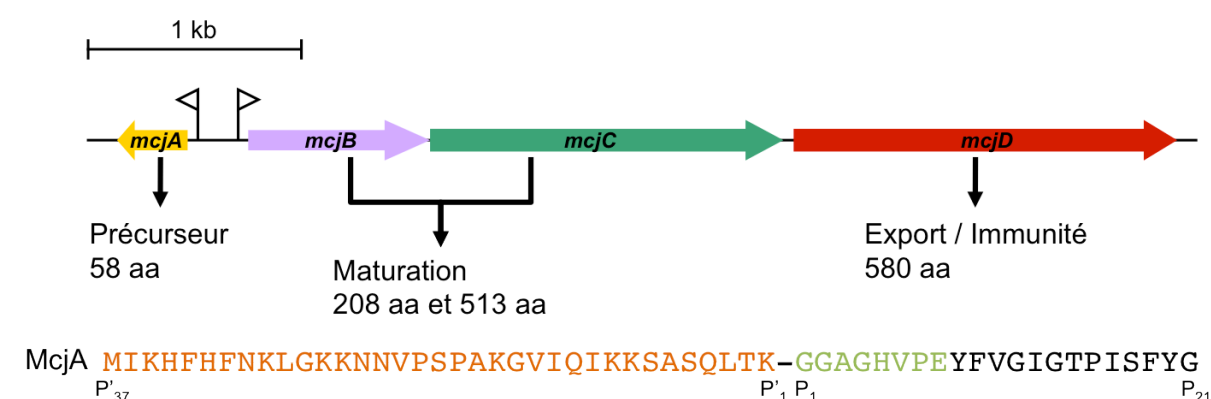


Figure 20 : Système génétique de MccJ25. Les gènes nécessaires à la biosynthèse du peptide lasso sont situés sur un unique plasmide pTUC202 et sous le contrôle de deux promoteurs. Le premier promoteur contrôle l'expression du gène codant le précurseur de 58 résidus (jaune), le deuxième contrôle l'expression des trois gènes des deux enzymes de maturation (violet et vert) et de la protéine d'export (rouge)¹⁵⁶. Le précurseur McjA est constitué d'une partie « leader » de 37 acides aminés (P'₃₇-P'₁) et du « core-peptide » (P₁-P₂₁). Les acides aminés constituant le cycle macrolactame sont représentés en vert.

II.2.1.2. Mécanisme de maturation de MccJ25

Etant donné la nature du précurseur McjA et la structure du peptide mature MccJ25, il est aisé d'imaginer quelles seraient les étapes de maturation dont sont responsables les enzymes McjB et McjC. Sans préjuger du rôle de telle ou telle

enzyme, on peut néanmoins penser que l'une d'entre elles (ou les deux associées en complexe) serait responsable du clivage de la partie leader du précurseur et la deuxième du repliement tridimensionnel du peptide et de la cyclisation des huit résidus N-terminaux. Cette maturation a été réalisée *in vitro* en incubant McjA, le précurseur linéaire, en présence des deux enzymes de maturation putatives (McjB et McjC) ainsi que des ions Mg^{2+} et de l'ATP¹⁶⁷. L'obtention de MccJ25 active a confirmé le rôle des deux enzymes dans la maturation du peptide et a montré, de plus, leur activité ATP/ Mg^{2+} -dépendante et suggère une indépendance du processus de maturation vis-à-vis de l'export du peptide.

Une étude de D. Clarke a néanmoins montré que le précurseur McjA était mûr en peptide actif *in vitro* en présence d'extraits de protéines membranaires provenant d'une souche d'*E. coli* exprimant l'opéron de MccJ25¹⁶⁸. Ceci amena les auteurs à conclure que les protéines McjB et McjC étaient localisées dans le cytoplasme à proximité de la face interne de la membrane plasmique. Des alignements de séquence de McjB, McjC et McjD permettent de faire l'hypothèse que McjB aurait une activité protéolytique, que McjC serait responsable de la cyclisation de manière ATP/ Mg^{2+} -dépendante et que McjD serait un transporteur membranaire de la famille des exporteurs ABC. La maturation de McjA en présence d'extraits membranaires nous amène aussi à conclure que les protéines McjB, McjC et McjD seraient associées dans un unique complexe tri-protéique et liées à la membrane plasmique par le domaine membranaire de McjD.

Récemment, plusieurs études sont venues clarifier le mécanisme de biosynthèse de MccJ25. L'étude du précurseur McjA, notamment, a permis de montrer qu'une région de sa partie « leader » était indispensable à la maturation du peptide¹⁶⁹. Des délétions successives de régions de la partie « leader » de McjA ont été effectuées et il apparaît qu'une grande partie du peptide « leader » n'est pas nécessaire pour produire un peptide possédant une activité antimicrobienne, mais que les cinq résidus situés en amont de la séquence du peptide mature sont absolument indispensables pour la maturation. Le précurseur minimal pour conduire à un peptide actif est donc McjA(33-58) et la séquence P'₅-P'₁ apparaît nécessaire à la maturation pour cliver et replier le peptide.

En outre, les enzymes de maturation McjB et McjC ont fait l'objet de deux études publiées très récemment qui confirment le rôle et la topologie du complexe de

maturation putatif. Pan *et al*¹⁷⁰ ont synthétisé des polypeptides constitués par la liaison chimique des trois protéines. Ils ont ainsi produit les polypeptides McjB-(GSSG)_n-McjC (avec n = 0, 1, 2, 5 ou 18) et McjD-(GSSG)₅-McjB-(GSSG)₅-McjC. Il apparaît que MccJ25 est produit par des bactéries présentant ces protéines fusionnées, ce qui renforce l'hypothèse d'un complexe de maturation ancré dans la membrane plasmique par le domaine membranaire de McjD. Par ailleurs, Yan *et al*¹⁷¹ ont montré, en produisant des variants des enzymes McjB et McjC et en regardant la production *in vitro* de MccJ25 à partir de McjA, le rôle de ces deux enzymes. Ainsi, McjB est une nouvelle cystéine-protéase ATP-dépendante dont l'activité ATPasique est sans doute liée au pré-repliement du précurseur. McjC est une lactame-synthétase qui catalyse l'activation de la fonction acide carboxylique de la chaîne latérale de Glu8 suivie de la cyclisation intramoléculaire du cycle macrolactame (Figure 21). Par ailleurs, chacune de ces deux enzymes nécessite la présence de l'autre pour être active, renforçant l'hypothèse d'un complexe structural McjB/McjC, appelé microcine J25-synthétase.

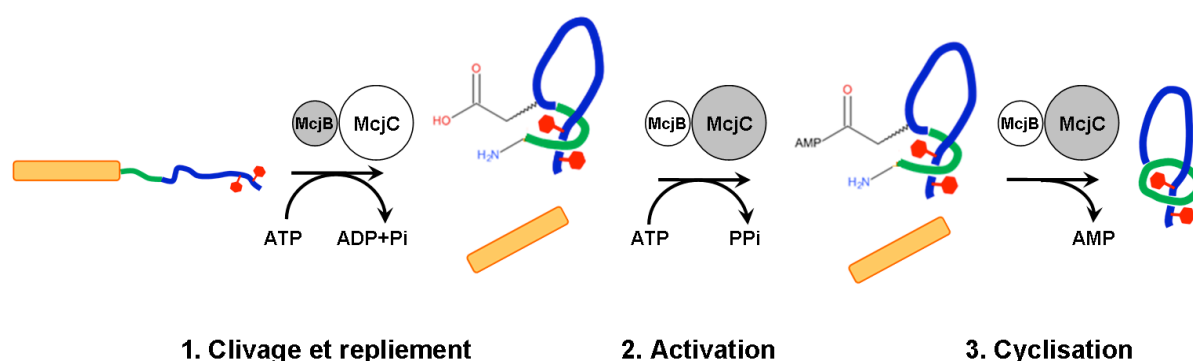


Figure 21 : Mécanisme de maturation de MccJ25 proposé¹⁷¹. L'enzyme active à chaque étape est représentée en grisé.

II.2.1.3. Régulation de la biosynthèse de MccJ25

La production de MccJ25 n'est pas homogène dans le temps et est contrôlée par deux facteurs : la phase de croissance de la population bactérienne et un certain nombre de régulateurs d'expression bactériens qui jouent le rôle d'inducteurs ou de répresseurs de l'expression du cluster de gènes de MccJ25.

Lors de la phase de croissance de la population bactérienne, il a été montré que l'expression du gène *mcjA* est fortement induite lorsque les cellules entrent

en phase stationnaire¹⁷². Par ailleurs, l'induction de l'expression de ce gène peut être activée en resuspendant des cellules en phase exponentielles dans un surnageant provenant d'une culture en début de phase stationnaire. Dans un milieu de culture pauvre en source de carbone et en phosphate inorganique, l'expression de *mcjA* est induite, ce qui sous-entend que la production de peptides antimicrobiens est liée à une compétition écologique entre souches phylogénétiquement proches, et donc susceptibles d'exploiter les mêmes ressources d'un milieu. En revanche, l'expression des gènes *mcjB* et *mcjC* (et sans doute *mcjD* puisqu'ils sont sous le contrôle du même promoteur), bien qu'elle soit aussi régulée par la phase de croissance de la population, serait induite durant la phase exponentielle, antérieurement à la synthèse de McjA (peut-être par « anticipation », pour qu'il y ait suffisamment d'enzymes de maturation disponibles lors de la production du précurseur). De surcroît, il a aussi été montré que la présence de fer dans le milieu diminuait drastiquement la production de MccJ25¹⁷³. Ce peptide emprunte la même voie d'import dans la cellule que le fer puisqu'il est reconnu par le récepteur aux sidérophores FhuA (voir II.2.1.4, p. 36), on peut donc penser qu'il est aussi produit dans un contexte de compétition pour l'accès au fer entre souches utilisant un système similaire d'internalisation.

L'expression du gène *mcjA* est sous le contrôle d'un promoteur alors que celle des autres gènes du « cluster » est sous le contrôle d'un deuxième promoteur (voir Figure 20, p. 33) et l'ensemble de l'expression de ce « cluster » dépend de la phase de croissance de la culture bactérienne. Afin de s'affranchir de cette limitation et de produire ce peptide dans des conditions permettant des applications biotechnologiques, Pan *et al*¹⁷⁴ ont produit des « clusters » de gènes de MccJ25 sous le contrôle de promoteurs inductibles, et dont l'expression donnait une production en peptide supérieure à celle obtenue naturellement. Cette expression n'était plus dépendante de la phase de croissance et permettait de produire le peptide dès la phase exponentielle.

II.2.1.4. Export du peptide mature

Afin d'être exportée dans le milieu extracellulaire, la bactérie productrice nécessite la protéine McjD. Un alignement de séquence de cette protéine a montré qu'elle présentait des similitudes de séquence avec les transporteurs de type ABC¹⁶⁵. La partie N-terminale de McjD correspondrait à un domaine

transmembranaire composé de six hélices α et la partie C-terminale comprendrait un domaine de liaison à l'ATP. Le fait que cette protéine soit aussi responsable de l'immunité de la bactérie productrice du peptide indique un mécanisme d'immunité reposant sur l'efflux du peptide hors du milieu cellulaire dont McjD serait la (ou une) composante.

Par ailleurs, la sécrétion de MccJ25 est sévèrement diminuée chez des cellules qui ne présentent pas la protéine TolC (Figure 22A), une protéine de la membrane externe des bactéries¹⁷⁵. Cette protéine est essentielle pour la cellule pour l'export de différents composés. Elle est constituée de trois monomères formant un canal transmembranaire de 35 Å de diamètre interne, ses hélices α constituent la partie membranaire de la protéine et un feuillet β forme un tonneau extracellulaire¹⁷⁶. Cependant, cette protéine ne fonctionne qu'en association avec une protéine accessoire. Il se trouve que la protéine codée par le gène *yojI*, quand il est exprimé chez une souche sensible à MccJ25, immunise cette souche contre le peptide lasso¹⁷⁷. Or YojI est connue pour être un transporteur de type ABC, similaire en séquence à McjD, et a été montré comme pouvant remplacer McjD lors de l'excrétion de MccJ25¹⁷⁷. Un modèle d'export tenant compte de ces données a donc été proposé (Figure 22B).

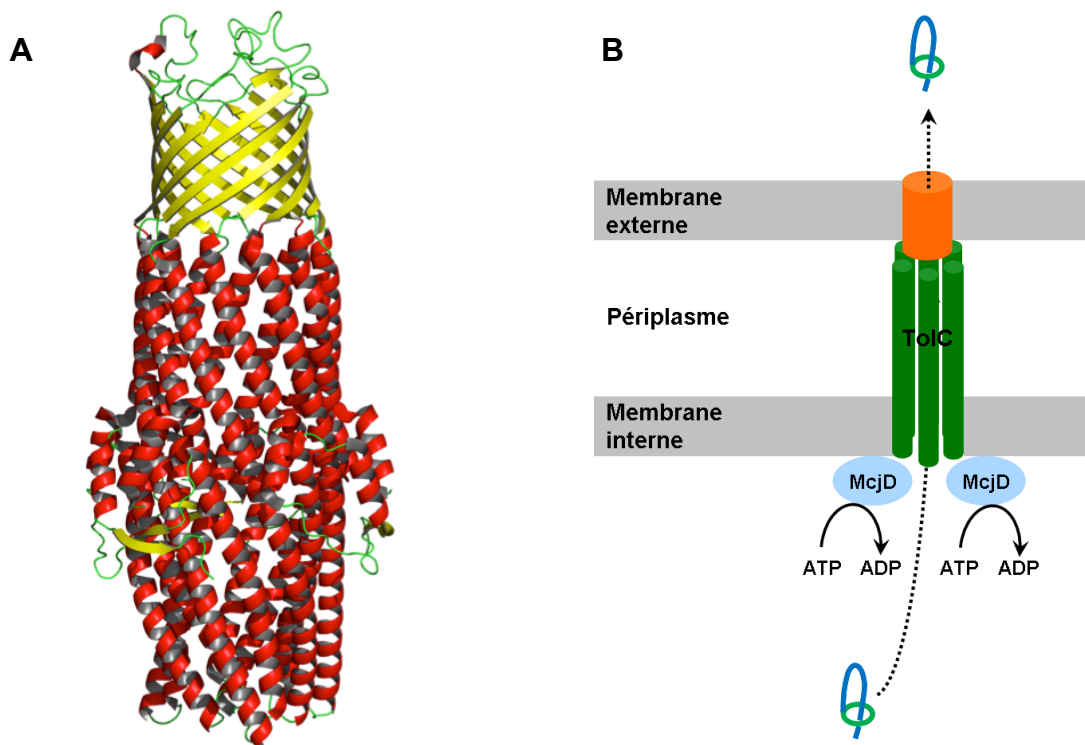


Figure 22 : A) Structure tridimensionnelle de la protéine transmembranaire TolC (PDB 1EK9¹⁷⁶) et B) mécanisme d'export de MccJ25 proposé par Vincent *et al.*¹⁵¹.

II.2.2. Structure tridimensionnelle de MccJ25

La résolution de la structure tridimensionnelle de MccJ25 a fait l'objet d'un grand nombre d'études^{143,145–147}. La liaison lactame est formée entre la fonction amine de Gly1 et la chaîne latérale de l'acide glutamique 8. La queue C-terminale générée est insérée dans le cycle macrolactame. La structure est très fortement stabilisée par des contraintes stériques fortes établies par les résidus aromatiques Phe19 et Tyr20 (Figure 23A) qui sont situés de part et d'autre du plan formé par le cycle et qui enchâssent la queue C-terminale dans celui-ci. La structure est ainsi fortement verrouillée et résistante aux dégradations chimiques et protéolytiques. Outre ce véritable « cadenas moléculaire », MccJ25 possède une boucle en épingle à cheveux (« β -hairpin ») constituée des résidus Tyr9 à Ser18. Elle présente aussi deux feuillets β anti-parallèles entre les résidus Phe10-Val11 et Thr15-Pro16 d'une part et les résidus Val6-Pro7 et Phe19-Tyr20 d'autre part.

MccJ25, soumise à une digestion par la thermolysine, ne forme qu'un seul peptide de digestion, hydrolysé au niveau de la liaison Phe10-Val11. Les contraintes stériques maintiennent les deux fragments peptidiques associés ensemble de manière non-covalente^{178,179} (Figure 23B).

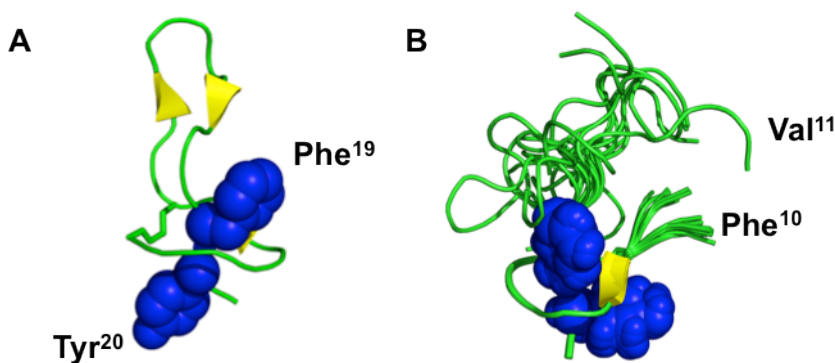


Figure 23 : Structures tridimensionnelles de A) MccJ25 (PDB 1Q71¹⁴⁵) représentant les résidus aromatiques (bleus) de part et d'autre du cycle macrolactame, et B) MccJ25 digérée par la thermolysine (PDB, 1S7P¹⁷⁹).

Cette structure particulière, même au sein de la famille des peptides lasso, présentant des contraintes stériques très fortes de chaque côté du cycle, a montré un comportement particulier en fragmentation par spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS). D'un côté, on observe des fragments de type b et y (ions acylium

et immonium) dans la queue C-terminale mais on observe aussi des ions bi-peptidiques provenant d'une fragmentation au sein de la boucle et constitués de l'association de régions de la queue C-terminale avec le cycle macrolactame, grâce aux seules contraintes stériques (Figure 24).

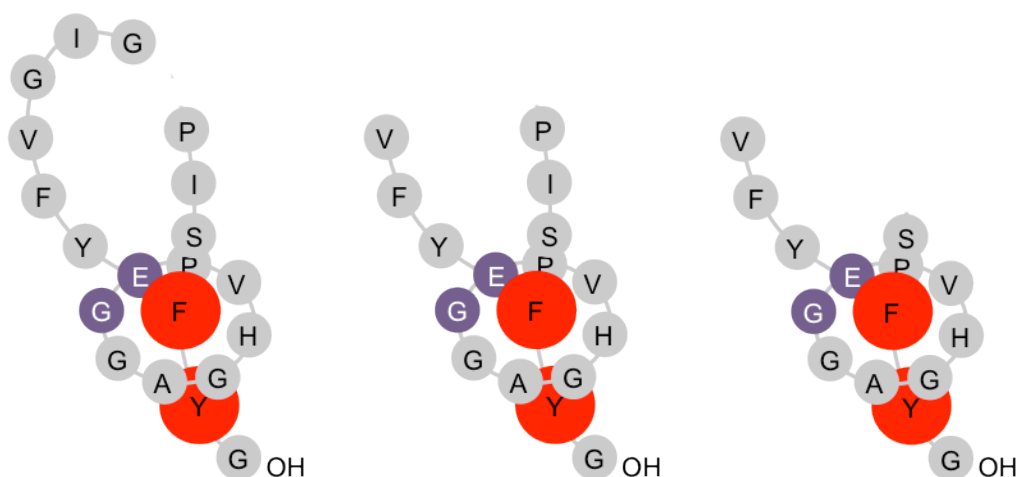


Figure 24 : Représentation des ions bi-peptidiques obtenus par dissociation induite par collision de MccJ25 (de gauche à droite : M-[T], M-[GIGT], M-[GIGTPI]).

II.2.3. Mécanisme d'action de MccJ25

Le mécanisme d'action de MccJ25 a fait l'objet d'un grand nombre de recherches au cours de la dernière décennie. Si on connaît maintenant avec plus de précision ses cibles moléculaires, l'ARN polymérase (ARNpol) et les mitochondries, il reste encore beaucoup à comprendre sur les régions structurales du peptide qui interviennent dans chacune des étapes du mécanisme.

II.2.3.1. Import du peptide dans le milieu intracellulaire

Une fois dans le milieu extracellulaire, MccJ25 doit être internalisée par la bactérie-cible. Dans ce phénomène d'import, le récepteur aux sidérophores FhuA s'est révélé indispensable pour la reconnaissance du peptide¹⁸⁰. FhuA est impliqué dans le transport du ferrichrome, peptide chélatant le fer pour permettre son import dans la cellule, et est aussi utilisé par des peptides antibiotiques parasitant la voie d'import du fer, comme l'albomycine et la colicine M¹⁸¹. Ce récepteur est constitué d'un tonneau β transmembranaire qui délimite un canal interne dont l'accès est fermé par un bouchon moléculaire à l'état de repos¹⁸². FhuA (Figure 25) n'est pas

seul à intervenir pour la reconnaissance du peptide MccJ25 puisque des souches présentant une protéine très similaire sont résistantes à l'activité de la microcine et sont rendues sensibles par insertion du gène *fhuA* d'une souche sensible dans leur génome¹⁵⁹. Enfin, l'inactivation de certains gènes de souches sensibles à MccJ25 a permis d'identifier des gènes nécessaires à l'import du peptide en générant des mutants aléatoires résistants¹⁸³. Ces gènes sont *fhuA*, *exbB*, *exbD*, *tonB* et *sbmA*. On a ainsi remarqué que les gènes des protéines ExbB, ExbD et TonB, impliquées dans l'import d'autres peptides antimicrobiens, microcines et colicines, jouaient aussi un rôle dans le mécanisme d'action de MccJ25. Le complexe de la membrane cytoplasmique TonB-ExbB-ExbD pourrait transmettre l'énergie de la force protomotrice nécessaire à l'import.

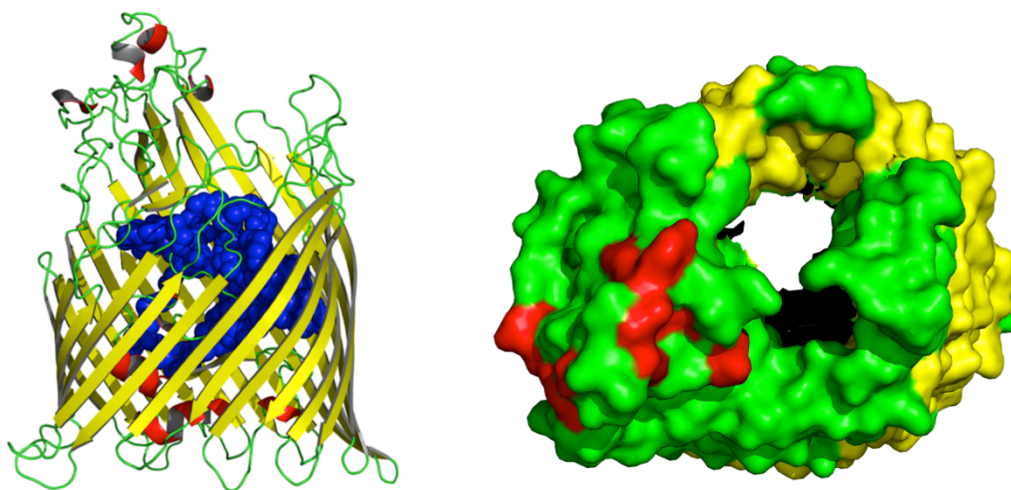


Figure 25 : Structure tridimensionnelle du récepteur aux sidérophores FhuA (PDB 1BY3¹⁸²). Le bouchon est représenté en bleu. A droite, vue du dessus montrant le canal interne en l'absence du bouchon moléculaire.

Le mécanisme d'import proposé est donc composé de trois étapes : (i) MccJ25 est reconnue par le récepteur FhuA situé dans la membrane externe, (ii) elle est ensuite internalisée vers le périplasme par FhuA grâce à l'énergie fournie par le complexe tri-protéique de la membrane interne TonB-ExbB-ExbD, puis (iii) elle traverse la membrane interne pour atteindre le cytoplasme de la bactérie-cible à l'aide de la protéine de la membrane interne SbmA (voir Figure 26). Cette dernière protéine est connue pour être utilisée dans l'import d'autres peptides antimicrobiens comme la microcine B17¹⁸⁴ ou le peptide Bac7 d'origine bovine¹⁸⁵.

II.2.3.2. Cibles du peptide

La recherche du mécanisme d'action antimicrobienne de MccJ25 s'est d'abord orientée vers un effet de perméabilisation des membranes bactériennes. En effet, une grande partie des peptides antimicrobiens est connue pour interagir avec les membranes bactériennes, s'y insérer et former des pores à travers lesquels les solutés cytoplasmiques s'échappent et l'eau du milieu extracellulaire rentre. La cellule meurt ainsi par lyse ou rentre en apoptose des suites de la perturbation de sa composition cytoplasmique¹⁸⁶.

MccJ25 possédant un certain nombre de résidus hydrophobes, donc susceptibles d'interagir avec la bicouche lipidique des membranes cytoplasmiques, les recherches se sont orientées vers la formation potentielle de pores dans les membranes des bactéries-cibles. Deux études permettent de conclure qu'effectivement MccJ25 interagirait avec des liposomes¹⁸⁷ ainsi qu'avec les lipides de la membrane cytoplasmique ou de la membrane mitochondriale¹⁸⁸. Cependant, bien que la première étude ne conclut pas sur le fait que cette interaction soit liée à l'activité antimicrobienne, la deuxième émettait l'hypothèse à la lueur de leurs résultats que la perméabilisation membranaire de la bactérie était directement impliquée dans la mort cellulaire, notamment dans le cas de la perturbation de la membrane mitochondriale.

Le mode d'action de MccJ25 implique cependant une autre cible moléculaire, l'ARNpol¹⁸⁹. L'isolement d'un mutant d'*E. coli* résistant à MccJ25 a permis d'identifier le gène *rpoC* comme responsable de cette résistance. Ce gène code la sous-unité β' de l'ARNpol. La transformation de la souche d'*E. coli* résistante par un plasmide portant le gène *rpoC* sauvage la rend sensible à l'activité de MccJ25, pointant le fait que l'ARNpol est bien une cible de MccJ25.

Enfin, indépendamment de son activité sur l'ARNpol, MccJ25 cible aussi les mitochondries eucaryotes en perturbant la chaîne respiratoire¹⁹⁰. En s'insérant dans les mitochondries, MccJ25 provoque l'augmentation de la concentration en ions superoxydes qui sont connus pour endommager irréversiblement les composants de la chaîne respiratoire. De plus, on a constaté une ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP), un gonflement des mitochondries et une fuite simultanée du cytochrome c provoquant la mort cellulaire^{191,192}.

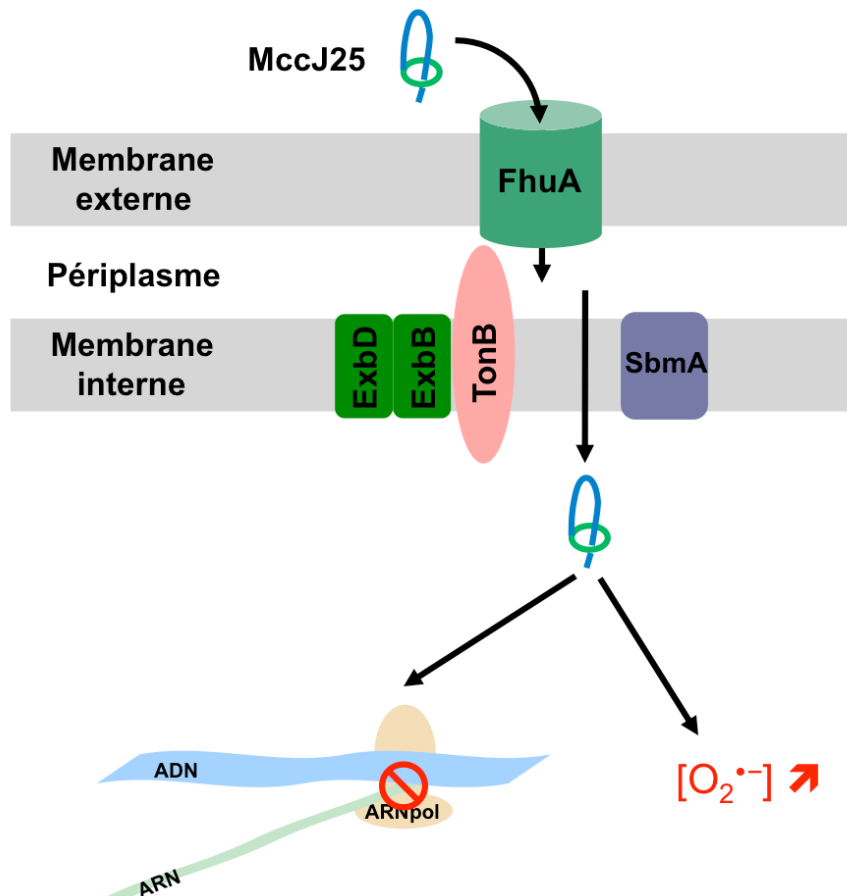


Figure 26 : Mécanisme d'action de MccJ25. Le peptide est internalisé par l'intermédiaire du récepteur aux sidérophores FhuA dans le périplasma, puis de la protéine SbmA en association avec le complexe TonB-ExbB-ExbD qui transmet l'énergie nécessaire à l'internalisation. Une fois dans le cytoplasme, MccJ25 cible (i) l'ARNpol et inhibe la transcription, ou (ii) la chaîne respiratoire en provoquant l'augmentation des ions superoxydes, ce qui perturbe fortement le système respiratoire de la cellule-cible.

II.2.4. Relations structure-activité

L'enjeu dans l'approfondissement du mécanisme d'action de MccJ25 est d'essayer de comprendre précisément quelles régions du peptide interagissent avec quelle(s) cible(s) et de quelle manière. Pour cela, les différentes études réalisées¹⁹³⁻²⁰⁴ ont globalement suivi un protocole identique, à savoir : (i) produire des variants du peptide lasso dont la séquence peptidique est ponctuellement différente et (ii) identifier à quel niveau du mécanisme d'action le variant produit présente une activité différente du peptide sauvage.

II.2.4.1. Interaction avec les protéines d'import

La première étape du mécanisme d'action de MccJ25, l'import du peptide

dans le milieu intracellulaire de la cellule-cible, fait intervenir un certain nombre de protéines mais seules deux ont montré une interaction avec MccJ25 : le récepteur de la membrane externe FhuA et la protéine de la membrane interne SbmA. Cette interaction peptide-protéine nécessite de la part des deux partenaires une reconnaissance entre deux régions structurales, voire entre quelques acides aminés seulement. La boucle de MccJ25, composée par la séquence peptidique V₁₁GIGTP₁₆, intervient lors de ce processus d'internalisation.

L'action de la thermolysine sur MccJ25 produit un fragment de digestion bi-peptidique dont les deux peptides ne sont plus liés de manière covalente mais uniquement associés par les contraintes stériques au niveau du cycle macrolactame^{178,179} (Figure 23B, p. 38). Le peptide hydrolysé entre Phe10 et Val11 présente une activité antimicrobienne résiduelle sur des souches *E. coli* et *S. enteritidis* sensible à MccJ25 native. Cependant, cette activité est très faible. En revanche, le peptide clivé est encore très actif sur l'ARNpol²⁰⁵. De plus, la transformation de ces bactéries sensibles par des plasmides portant les gènes *fhuA* et *sbmA* modifiés montre que l'activité antimicrobienne résiduelle de MccJ25 hydrolysée disparaît. Ces résultats impliquent donc que la boucle de MccJ25 intervient dans l'import du peptide.

Des expériences d'interaction directe de MccJ25 avec le récepteur FhuA ont été menées dans notre laboratoire par chromatographie d'exclusion et par titration calorimétrique isothermique²⁰⁶. Les résultats montrent que ce sont la boucle du peptide lasso et les boucles extra-membranaires du récepteur qui interagissent pour l'internalisation du peptide dans le périplasme. Par ailleurs, l'existence d'un motif commun à la microcine B17 et MccJ25, VGIG, toutes deux reconnues par le récepteur FhuA, a laissé penser qu'il pouvait être la zone de reconnaissance précise du peptide par FhuA. La production d'un variant de MccJ25 portant la substitution I13K inactif a montré l'importance de ce résidu dans l'interaction entre MccJ25 et le récepteur²⁰⁰.

L'étude de variants de la microcine chez lesquels His5, située dans le cycle macrolactame, est substituée par différents résidus a quant à elle montré que ce résidu était nécessaire à l'interaction avec la protéine SbmA¹⁹⁶. L'utilisation d'une souche d'*E. coli* sensible chez laquelle le transport par FhuA a été court-circuité a révélé que le peptide était toujours inactif malgré une activité *in vitro* sur l'ARNpol.

II.2.4.2. Liaison avec la membrane cellulaire

L'étude de l'interaction de MccJ25 avec la membrane cellulaire ou mitochondriale en utilisant la spectroscopie de fluorescence et un variant I13W de MccJ25 a montré que celle-ci s'insérait dans la membrane de liposomes et en s'intercalant à l'interface des lipides. La température apparaît jouer un rôle important dans cette interaction peptide-membrane puisque le peptide interagit d'autant plus fortement avec les lipides que la température diminue²⁰².

II.2.4.3. Production de superoxyde

L'interaction de MccJ25 avec la membrane cytoplasmique produit entre autres des ions superoxydes $O_2^{\bullet-}$, qui sont toxiques pour la cellule et amènent à la dislocation de la chaîne respiratoire. La production d'un variant MccJ25[I13K] marqué par FITC a permis de suivre la production de ces ions en fonction de la concentration locale en protons¹⁹⁹. Malgré l'insertion d'un protonophore qui empêche l'internalisation du peptide en dissipant la force protomotrice, son interaction *in vitro* avec le système respiratoire ou avec l'ARNpol n'est pas affectée et on constate que la dissipation de la force protomotrice s'oppose à l'interaction avec la polymérase mais augmente fortement la production de $O_2^{\bullet-}$.

Les acides aminés pouvant être impliqués dans la production des superoxydes sont les résidus tyrosines, Tyr9 et Tyr20, capables de subir une réaction d'oxydo-réduction au niveau de leur groupement phénol. La substitution des deux tyrosines par des résidus aromatiques phénylalanines incapables d'être oxydés a révélé que ces variants sont internalisés et restent actifs sur l'ARNpol mais seul le variant MccJ25[Y9F] est sans effet sur la concentration en ions superoxydes. Le résidu crucial dans la production de ces ions semble donc être le résidu Tyr9^{198,201}. L'internalisation de ces deux variants ainsi que leur activité sur l'ARNpol semble aussi indiquer que les variants ont conservé leur structure en lasso.

II.2.4.4. Interaction avec l'ARNpol

L'interaction du peptide lasso avec l'ARNpol s'effectue à des constantes cinétiques très faibles, $K_i = 1,4 \mu M^{207}$, ce qui suggère que l'ARNpol est la cible

principale de MccJ25 dans le milieu intracellulaire. MccJ25 bloque la traduction par l'ARNpol²⁰⁸, utilisant ainsi une voie similaire à celle de nombreux antibiotiques couramment utilisés actifs sur l'ARNpol (streptomycine, gentamycine, chloramphénicol...). La faible CMI de MccJ25 suggère qu'elle pourrait à terme être utilisée comme palliatif aux antibiotiques usuels.

Des expériences de mutagenèse dirigée sur l'ARNpol ont permis de déterminer la zone d'interaction de cette protéine avec MccJ25²⁰⁹. Des études ultérieures plus précises ont révélé que MccJ25 interagissait avec le canal d'élongation en l'obstruant²⁰⁷ (voir Figure 27B).

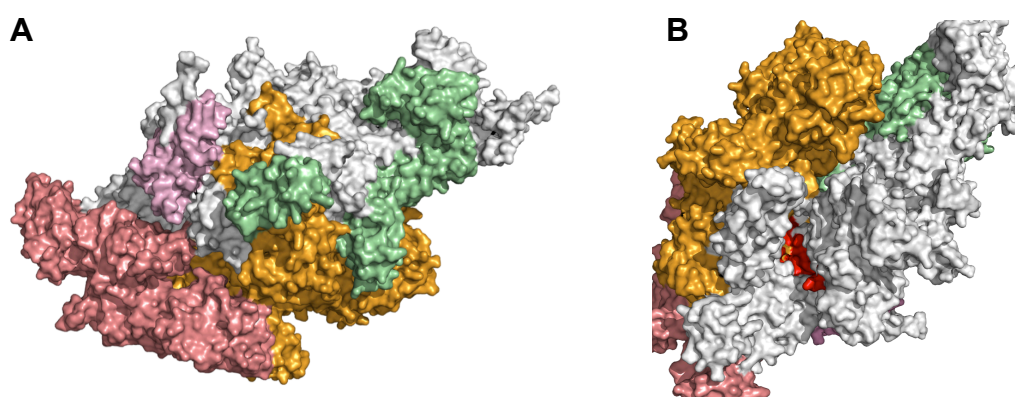


Figure 27 : A) Structure tridimensionnelle de l'ARNpol (PDB 1IW7²¹⁰). B) Zoom sur la zone d'interaction de MccJ25 avec l'ARNpol. Les couleurs représentent les sous-unités : α (saumon), β (orange), β' (blanc), ω (rose), σ^{70} (vert). Les résidus du site d'interaction de MccJ25 dans le canal d'élongation sont représentés en rouge.

MccJ25 hydrolysée par la thermolysine ainsi que MccJ25 dont les résidus 13 à 17 manquent, restent actives sur l'ARNpol, ce qui exclut la région de la boucle du peptide lasso comme étant impliquée dans l'inhibition de l'ARNpol¹⁹⁴.

La modification chimique de la glycine C-terminale par amidation a permis de montrer que cette région était directement impliquée dans l'interaction avec l'ARNpol mais pas dans le mécanisme de perturbation de la chaîne respiratoire¹⁹⁵. Des modifications sur les résidus His5 et Gly21 ont permis de déterminer leur rôle crucial dans l'activité de MccJ25 sans parvenir à conclure sur le niveau de leur intervention¹⁹³.

Deux régions structurales de MccJ25 se dégagent donc de ces différentes études : d'une part, la **boucle** qui interagit avec le récepteur aux sidérophores de la membrane externe FhuA, et d'autre part, le **cycle macrolactame associé à la queue C-terminale** qui est impliqué dans l'obstruction du canal d'élongation de

l'ARNpol (voir Figure 28).

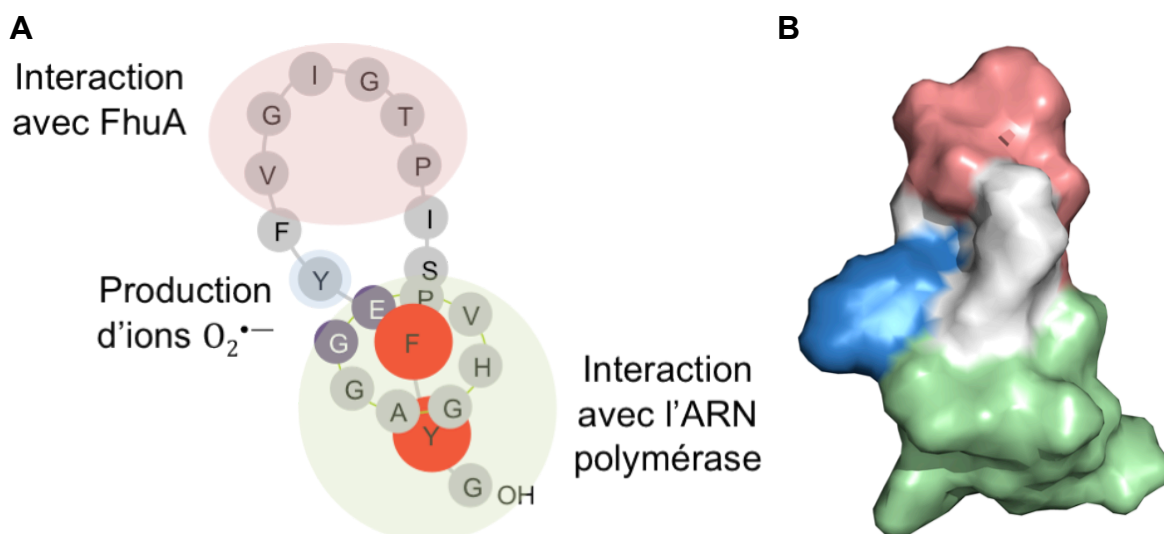


Figure 28 : Régions structurales impliquées dans le mécanisme d'action de MccJ25. A) Représentation schématique des régions de MccJ25. **B)** Surface de MccJ25 colorisée selon l'implication des régions dans le mécanisme d'action. La boucle (saumon) interagit avec le récepteur FhuA, le résidu Tyr10 (bleu) intervient dans la production d'ions superoxydes et le cycle macrolactame ainsi que la queue C-terminale (vert) interagissent avec l'ARNpol.

II.2.5. Exploitation du potentiel bioactif de MccJ25

L'activité antimicrobienne de MccJ25 combinée à sa structure compacte très stable a attiré l'attention de plusieurs équipes internationales afin d'utiliser son potentiel biotechnologique pour le développement de peptides bioactifs.

Les premières recherches à vue thérapeutique sur MccJ25 ont d'abord consisté à déterminer si ce peptide possédait une activité antimicrobienne sur des souches bactériennes pathogènes comme les *E. coli* diarrhégeniques²¹¹. Celle-ci présente effectivement une activité avec une CMI de l'ordre de 0,5 μ M pour la souche la plus sensible. Les auteurs ont aussi réussi à utiliser ce peptide comme conservateur alimentaire en l'injectant dans des préparations lactées contaminées et en observant une élimination des souches pathogènes²¹¹.

MccJ25 possède un spectre d'activité étroit. Afin de l'élargir, il a été envisagé de perméabiliser les membranes de bactéries à Gram négatif, comme *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Moraxella catarrhalis*, et *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. L'utilisation d'un perméabilisant membranaire associé à MccJ25 a montré une activité antimicrobienne intéressante chez certaines souches jusque-là

résistantes²¹².

Par ailleurs, certaines recherches ont montré qu'une simple amidation de la glycine C-terminale pouvait rendre MccJ25 active contre des cellules eucaryotes²⁰⁴. Le peptide modifié inhibe l'activité de l'ARNpol de fibroblastes de mammifère (*Chlorocebus sabaeus*, singe vert), de manière similaire à son activité sur les procaryotes, et provoque l'entrée en apoptose de la cellule.

En outre, MccJ25 a montré une stabilité au sein de matrices biologiques complexes comme du sang humain, du plasma ou du sérum²¹³. Après 24 h d'incubation, MccJ25 garde son activité antimicrobienne et ne montre pas d'activité hémolytique. Enfin, l'injection de MccJ25 chez une souris infectée par injection intrapéritonéale de *Salmonella* a permis de diminuer drastiquement la quantité de bactéries pathogènes. C'est, à ce jour, la seule étude à visée thérapeutique menée *in vivo* avec un peptide lasso.

Les premières études du mécanisme d'activité de MccJ25 ont montré sa tolérance à certaines modifications, notamment aux substitutions de ses résidus (variants MccJ25[I13K], MccJ25[I13W], MccJ25[Y9F] et MccJ25[Y20F]). Cette possibilité a laissé envisager des perspectives de bio-ingénierie en utilisant le squelette peptidique de la structure lasso et en lui greffant des épitopes d'activité biologique intéressante ou en essayant d'augmenter son potentiel antimicrobien^{156,214}.

L'équipe de K. Severinov a étudié la tolérance du peptide à la mono-substitution de chacun de ses résidus. Les résultats montrent que certaines positions sont critiques pour la production et pour l'activité de MccJ25 sur l'ARNpol mais seuls quelques uns d'entre eux ont montré une activité antibactérienne supérieure à celle du peptide natif¹⁹⁷. Cette étude montre en outre que chaque région de MccJ25 ne possède pas la même tolérance à la substitution. Ainsi, la boucle apparaît beaucoup plus tolérante que le cycle macrolactame et la queue C-terminale (Figure 29).

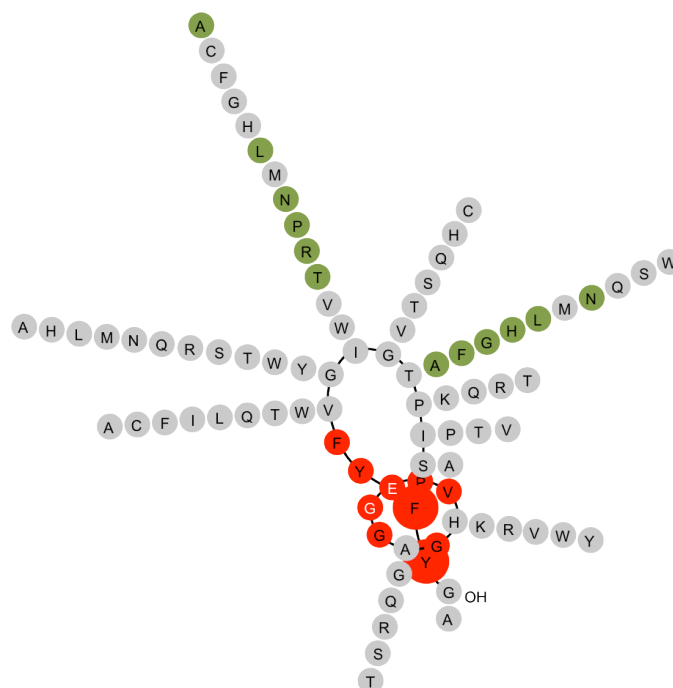


Figure 29 : Variabilité de chaque position de la séquence peptidique de MccJ25 permettant de conserver l'activité antibactérienne¹⁹⁷. Les résidus qui ne tolèrent aucune substitution sont représentés en rouge, les résidus verts correspondent à des variants qui présentent une activité antibactérienne similaire ou supérieure à celle du peptide natif.

A la suite de l'étude précédente, l'équipe de J. Link a produit un grand nombre de variants de MccJ25 dont une centaine a montré une activité antimicrobienne²⁰³. Il s'avère que la plupart de ces variants présentent des substitutions multiples au niveau de la boucle alors que les substitutions au niveau du cycle macrolactame sont moins bien tolérées.

Récemment, une étude a révélé le potentiel de bio-ingénierie de peptides actifs en utilisant le squelette peptidique de MccJ25 comme base²¹⁴. Elle a consisté à produire un variant de MccJ25 présentant une boucle modifiée (substitution de G₁₂I_{G14} par R₁₂GD₁₄) afin de produire un antagoniste aux intégrines. Ces récepteurs transmembranaires sont impliqués dans différentes fonctions de la cellule comme l'import de composés nécessaires à sa survie.

La synthèse chimique de peptides lasso est à ce jour toujours infructueuse, la production de peptides lasso nécessitant la machinerie enzymatique. L'introduction de ponts disulfure pour bloquer la structure a été envisagée par Soudy *et al.*²¹⁵, dans le but d'augmenter l'activité antibactérienne de MccJ25. Bien que cette approche n'ait pas permis aux auteurs de conserver la structure lasso, certains de ces peptides de synthèse présentent une activité antimicrobienne, mais de moindre importance que celle de MccJ25.

II.3. Les autres peptides lasso

II.3.1. Biosynthèse

L'étude de MccJ25 a permis de mettre en évidence un système de biosynthèse commun à tous les peptides lasso. Les peptides lasso sont d'abord produits sous la forme d'un précurseur (LasA) dont la partie N-terminale constitue une séquence « leader » et la partie C-terminale comprend la séquence du peptide mature. Le précurseur est ensuite modifié post-traductionnellement par clivage, et repliement sous l'action de deux enzymes (LasB et LasC) pour positionner la queue C-terminale et fermer le cycle macrolactame. Une quatrième protéine (LasD), de type ABC-transporteur, permet l'export du peptide dans le milieu extracellulaire et confère de plus à la bactérie l'immunité contre sa propre production (Figure 30).

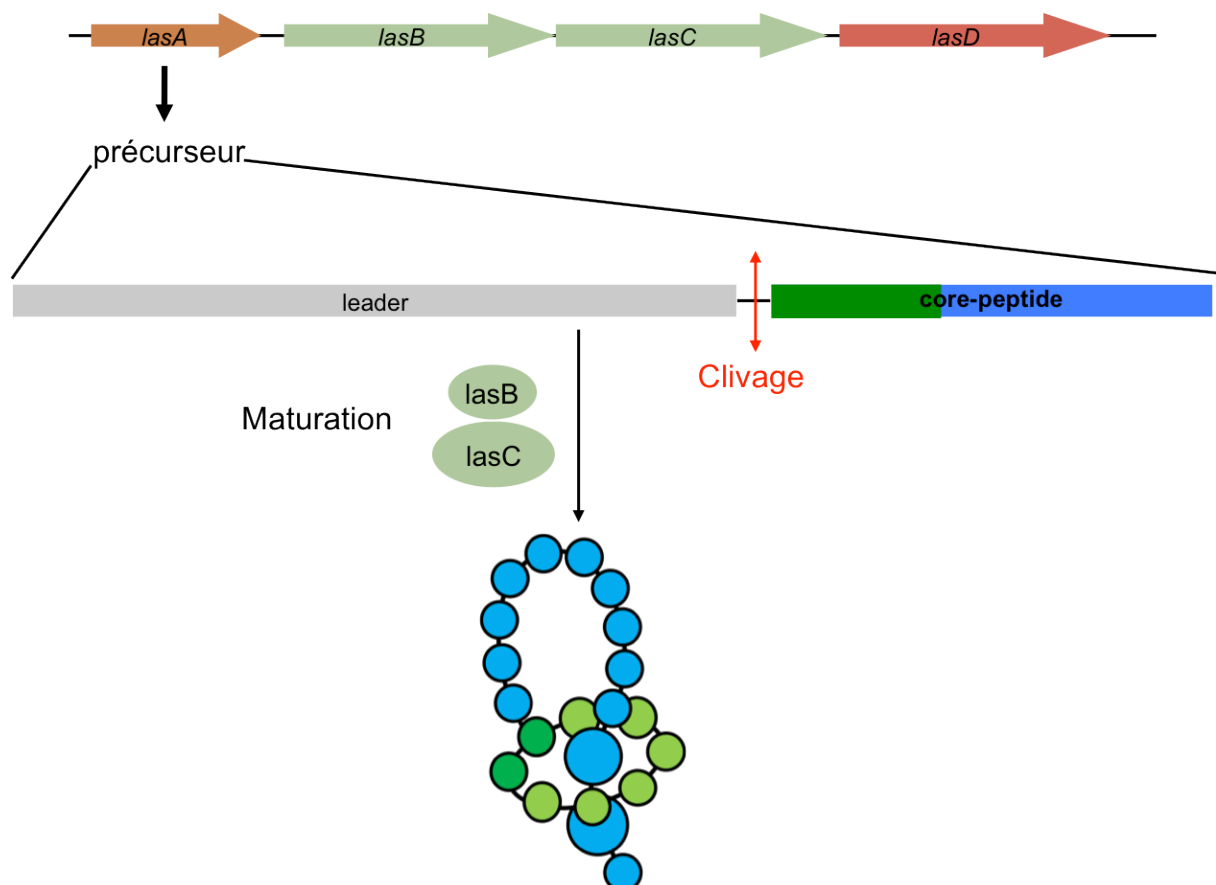


Figure 30 : Schéma de biosynthèse des peptides lasso. Le précurseur codé par le gène *lasA* est constitué d'une partie « leader » et du « core-peptide » C-terminal. Sa maturation sous l'action des enzymes LasB et LasC forme le peptide lasso.

La stratégie d'exploration de génomes^{154,216} (« genome mining ») a permis de confirmer une voie de biosynthèse commune et de découvrir de nouveaux peptides lasso²⁰⁵. En utilisant le gène *mcjB* comme sonde, on recherche *in silico* les gènes présentant des homologies de séquence. Puis, une fois un tel gène isolé, on explore dans son voisinage si un gène codant une lactame-synthétase (de type McjC) ainsi qu'un précurseur potentiel pour un peptide lasso sont présents. Cette technique de comparaison des séquences génétiques de génomes bactériens, dans le but de découvrir des systèmes génétiques de peptides lasso putatif, se répand actuellement parmi les équipes étudiant ces molécules et a permis la mise en évidence de nouveaux représentants de la famille lasso comme la capistruine. La mise au point d'un nouvel algorithme de recherche qui utilise la similarité de séquence des précurseurs a permis très récemment la découverte et la caractérisation de l'astexine-1¹²⁵.

II.3.2. Activités biologiques des peptides lasso

Les activités biologiques décrites pour les peptides lasso isolés à ce jour se répartissent en plusieurs catégories : antagonisme de récepteur aux hormones, activité antimicrobienne, activité antivirale et inhibition d'enzymes, cette dernière activité pouvant se traduire par un effet antimicrobien (inhibition de l'ARNpol).

II.3.2.1. Antagonisme de récepteurs aux hormones

L'**anantine** est un antagoniste du récepteur au facteur natriurétique auriculaire¹³⁴, hormone cardiaque qui régule l'homéostasie de certains ions et de l'eau, et diminue la pression artérielle sur les cellules musculaires lisses vasculaires. L'anantine se fixerait au site du ligand au niveau du récepteur et empêcherait la relaxation des vaisseaux sanguins, agissant ainsi comme un vasoconstricteur.

De manière similaire, le peptide **RES-701-1** est un antagoniste de récepteurs aux endothélines 1, 2 et 3 (ET-1, ET-2 et ET-3)¹⁴⁰. Les endothélines sont des peptides qui interviennent largement dans de nombreuses fonctions liées aux tissus vascularisés ou non, notamment dans des effets hémodynamiques, cardiaques, pulmonaires et rénaux. Ces endothélines possèdent une structure compacte composée de 21 acides aminés et de deux ponts disulfure (Figure 31).

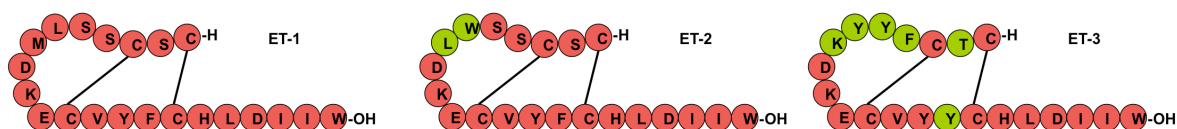


Figure 31 : Structures des endothélines. Les résidus qui diffèrent de la séquence de ET-1 sont représentés en vert.

La fixation d'ET-1 par le récepteur ET_A induit une vasoconstriction, alors que sa liaison au récepteur ET_B amène à une vasodilatation. RES-701-1 conduit à une réponse antagoniste du récepteur ET_B de manière hautement spécifique, illustrée par une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca²⁺ et une abolition de la diminution de pression artérielle par ET-1²¹⁷. L'étude de l'activité de l'analogue du peptide RES-701-1 synthétisé chimiquement sur des récepteurs humains a montré que son affinité était bien moindre que celle du peptide bio-synthétisé, de l'ordre du micromolaire au lieu du nanomolaire^{218,219}. Les auteurs expliquaient ce résultat par une différence de structure tridimensionnelle entre les deux peptides après avoir élucidé pour la première fois la structure non-lasso chez un peptide topoïsomère de synthèse. RES-701-1 a ensuite été le premier peptide lasso ayant subi des modifications de sa structure primaire dans le but d'augmenter son activité biologique. Des analogues de RES-701-1 présentant des modifications de sa partie C-terminale ont été synthétisés et leur affinité pour le récepteur ET_B a été étudiée^{220,221}. Il apparaît que la délétion ou la substitution de l'acide aminé Trp16 ne réduisait pas l'activité de liaison du peptide au récepteur. Ce peptide a aussi fait l'objet de modifications intéressantes qui ont permis l'obtention de peptides hybrides entre le peptide lasso sauvage et ET-1^{222,223}. Le cycle macrolactame de RES-701-1 a été chimiquement associé à la partie C-terminale de ET-1 (Figure 32) et les produits obtenus, bien que non structurés en lasso, ont présenté une affinité pour ET_B supérieure à celle du peptide lasso natif, augmentant ainsi son activité antagoniste.

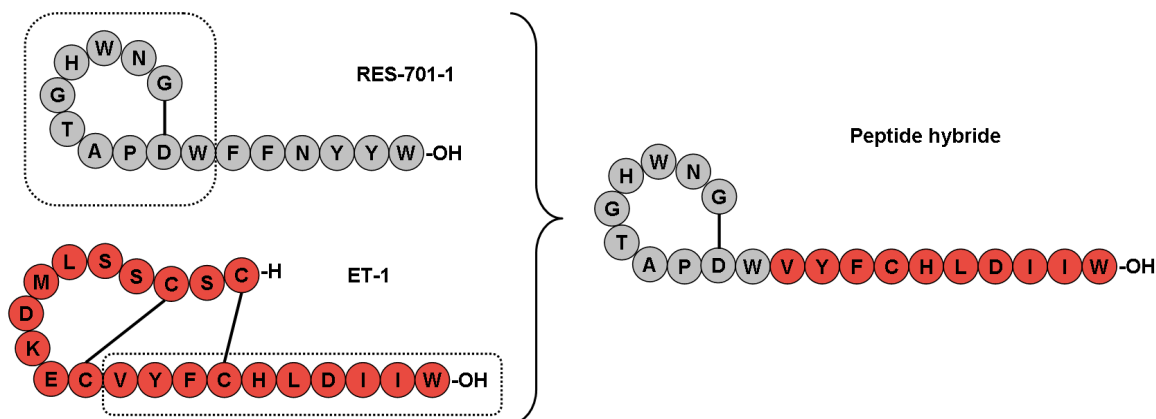


Figure 32 : Synthèse de peptide hybride entre RES-701-1 (gris) et ET-1 (rouge)^{222,223}.

Le peptide **BI-32169** a été identifié chez un *Streptomyces* à la suite d'un programme de recherche de nouveaux antagonistes pour le récepteur au glucagon¹⁵¹.

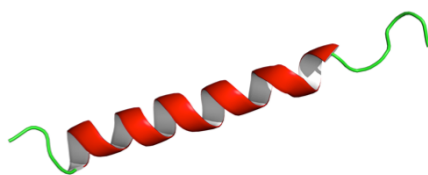


Figure 33 : Structure tridimensionnelle du glucagon (PDB 1GCN²²⁴).

Le glucagon (Figure 33), une hormone peptidique de 29 acides aminés synthétisée dans le pancréas, se fixe à des récepteurs spécifiques des cellules du foie où il induit la production de glucose hépatique par glycogénolyse et gluconéogenèse. Sa liaison à son récepteur membranaire entraîne une cascade d'induction dont un marqueur est l'augmentation de la concentration intracellulaire en adénosine mono-phosphate cyclique (AMPc). Or la purification et l'utilisation de BI-32169 sur une lignée cellulaire présentant dans sa membrane les récepteurs humains au glucagon en présence de cette hormone, ont montré une inhibition de l'augmentation de l'AMPc dans le cytoplasme, démontrant l'activité antagoniste de BI-32169 au glucagon. Celle-ci est environ 45 fois plus importante qu'un autre produit naturel se fixant aux récepteurs au glucagon, la céphalochrome, molécule de référence présentant une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) des récepteurs au glucagon de 20 μ M.

II.3.2.2. Activité antibactérienne

Une activité antibactérienne a été décrite pour un grand nombre de peptides lasso (Tableau 7).

Les **siamycines I et II**, qui ne diffèrent que d'un acide aminé dans leur séquence de 21 résidus, possèdent une activité antimicrobienne dirigée contre des bactéries à Gram positif, en particulier contre *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* et *Bacillus subtilis*.

Les **lariatines A et B** possèdent une importante activité antimycobactérienne contre notamment *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium smegmatis*. Une étude sur la lariatine A a montré l'importance du résidu Lys17 pour son activité²²⁵.

MccJ25 présente un spectre d'activité étroit dirigé contre des entérobactéries (*Escherichia* et *Salmonella*) et l'étude de l'activité antimicrobienne de la **capistruine** a montré que ce peptide agissait avec un mode d'action similaire à celui de MccJ25 en inhibant l'élongation de la transcription chez *Burkholderia*. Par ailleurs, les auteurs ont montré qu'une souche résistante à MccJ25 s'avérait aussi résistante à la capistruine, mettant en évidence l'existence d'un mécanisme de résistance commun à ces peptides lasso²¹⁵ bien que leurs spectres d'activité soient différents. Le dernier peptide lasso de type II récemment découvert, l'**astexine-1** produite par la bactérie aquatique *Asticcaucalis excentricus*, est actif lui aussi contre une souche phylogénétiquement proche, *Caulobacter crescentus*¹³⁵.

De manière générale, les peptides lasso sont actifs contre des souches phylogénétiquement proches de la souche productrice. Cette proximité phylogénétique suggère qu'ils jouent un rôle écologique important dans une compétition entre bactérie.

L'activité antimicrobienne des peptides lasso a généralement été testée sur des souches à Gram positif et négatif et le récapitulatif de leurs activités connues est résumé dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Origine bactérienne et activité antimicrobienne des peptides lasso. - : peptide inactif ; + : CMI de l'ordre de 10 μ M ; ++ : CMI de l'ordre de 1 μ M ; +++ : CMI de l'ordre de 0,1 μ M ; n.d. : CMI non-déterminée.

Nom	Souches productrices		Souches sensibles	
	Gram +	Gram -	Gram +	Gram -
Classe I				
Siamycines	✓		++	-
RP-71955	✓		n.d.	n.d.
Classe II				
Lariatines	✓		++	n.d.
Anantine	✓		n.d.	n.d.
Propeptine	✓		+	n.d.
RES-701-1	✓		n.d.	n.d.
Capistruine		✓	n.d.	+
Astexine-1		✓	n.d.	+
MccJ25		✓	-	+++
Classe III				
BI-32169	✓		n.d.	n.d.

II.3.2.3. Activité antivirale

Les **siamycines** présentent une activité antivirale contre le virus d'immunodéficience humaine (HIV-1) et le virus de l'herpès (*Herpes simplex virus*, HSV)¹³⁹. La siamycine I agit en empêchant la fusion membranaire entre les cellules infectées par le virus HIV-1 et les cellules saines mais n'a aucun effet sur la fusion de cellules infectées par le virus de Sendaï ou sur la fusion de myoblastes de souris. Cette fusion est réversible, ce qui indique que la siamycine I se fixe de manière non-covalente à sa cible. Ces résultats ont amené les auteurs à postuler que le peptide lasso se fixerait non-covalamment à une ou des glycoprotéines (dont la protéine codée par le gène *gp160*) de la membrane des cellules infectées, et empêcherait par ce biais la fusion cellulaire²²⁶.

II.3.2.4. Activité inhibitrice d'enzymes autres que l'ARNpol

La **siamycine I** (MS-271) présente une activité inhibitrice de la kinase de la chaîne légère de la myosine (« myosin light chain kinase », MLCK)¹⁶². Cette enzyme joue un rôle important dans la contraction des muscles lisses en phosphorylant la

chaîne légère de la myosine, ce qui facilite l'interaction de cette dernière avec le filament d'actine et permet la contraction. Les auteurs ont montré l'inhibition de l'activité de la MLCK par MS-271 alors que ce peptide n'avait aucun effet sur d'autres kinases comme la protéine kinase AMPc-dépendante ou la protéine kinase C. Récemment, une étude a montré que la siamycine I possédait aussi une activité inhibitrice de la kinase FsrC, une enzyme de détection du quorum bactérien, ainsi que d'autres enzymes ATP-dépendantes²²⁷.

La **propeptine** est un inhibiteur de la prolyl-endorpeptidase (PEP) qui requiert la présence des deux acides aminés C-terminaux, Ser18 et Pro19, pour son activité²²⁸. Cette enzyme est une oligopeptidase qui hydrolyse les hormones peptidiques et les neurotransmetteurs du côté C-terminal des prolines. Le fait qu'elle soit inhibée par la propeptine permet d'envisager une utilisation thérapeutique de ce peptide afin de prolonger la durée de vie des hormones peptidiques et des neurotransmetteurs.

II.3.3. Structures tridimensionnelles

L'intégralité des structures de peptide lasso a été résolue par modélisation moléculaire sous contraintes spatiales établies par RMN. Jusqu'à maintenant, un seul peptide lasso (BI-32169) a aussi été résolu par cristallographie aux rayons X²²⁹ mais sa structure avait déjà été déterminée par RMN précédemment¹⁵².

II.3.3.1. Peptides lasso de classe I

La première structure tridimensionnelle d'un peptide lasso est celle du peptide **RP-71955**, qui date de 1994¹⁴⁸. Cette structure résolue par RMN met en évidence d'une part la topologie de la famille des peptides lasso mais elle montre de plus que celle-ci est stabilisée par deux ponts disulfure établis entre des résidus du cycle macroclactame et de la boucle ou de la partie C-terminale (Figure 34A).

Cette topologie sera par la suite étayée avec la résolution des structures des **siamycines I** (aussi appelée MS-271) et **II** dont la séquence peptidique ne diffère entre elles ainsi qu'avec RP-71955 que d'un acide aminé^{149,161,163}.

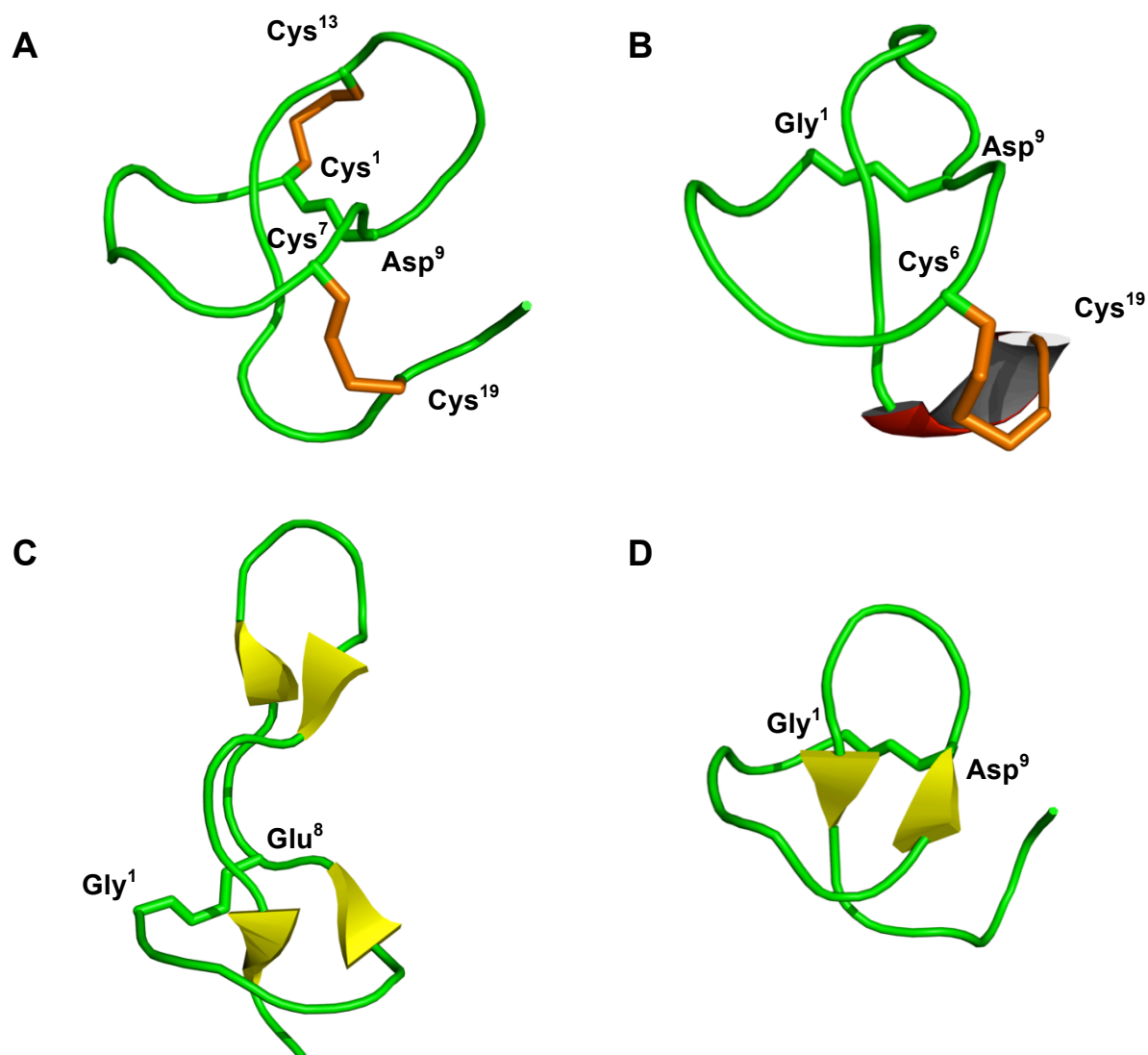


Figure 34 : Structures tridimensionnelles de peptides lasso. A) RP-71955 (classe I, PDB 1RPB¹⁴⁸) ; **B)** BI-32169 (classe III, PDB 3NJW¹⁵²) ; **C)** MccJ25 (classe II, PDB 1Q71¹⁴⁵) ; **D)** capistraine (classe II¹⁵⁴).

II.3.3.2. Peptides lasso de classe II

Les peptides lasso de classe II ont été isolés et caractérisés plus tardivement que ceux de classe I. Outre MccJ25 dont la structure a été décrite dans le paragraphe II.2.2, RES-701-1, les lariatines et la capistraine ont été caractérisées par RMN.

Bien que la structure primaire de l'**anantine** ait été caractérisée par RMN avant celle des peptides de classe I²³⁰ et qu'elle mette en évidence le macrocycle constitué par les huit premiers acides aminés, l'analyse tridimensionnelle de ce peptide n'a pas été poussée plus avant hormis une étude de fluorescence révélant

un « quenching » de la fluorescence du Trp5 du cycle macrolactame par His12 située dans la boucle du peptide²³¹. Cette étude a montré une intéressante corrélation spatiale entre ces deux résidus qui ne pourra s'expliquer que plus tard après la résolution de la structure lasso. Celle-ci force ainsi les résidus à se rapprocher spatialement, ce qui permet le « quenching » de fluorescence observé.

Le peptide **RES-701-1** a été le premier peptide lasso de classe II dont la structure a été mise en évidence. Après avoir déterminé la structure primaire¹⁴⁰, les auteurs ont montré que ce peptide possédait un signal de CD différent de son analogue linéaire, présentant une bande négative aux alentours de 192-227 nm ainsi qu'une bande positive vers 230 nm²³². La structure tridimensionnelle du peptide a ensuite été résolue, et montre le cycle macrolactame constitué par les neuf premiers acides aminés N-terminaux à l'intérieur duquel vient s'insérer la queue C-terminale. La structure est stabilisée par deux résidus aromatiques Tyr14-Tyr15 situés de part et d'autre du cycle macrolactame et qui empêchent la queue C-terminale de s'échapper du cycle¹⁵⁰.

La structure primaire de la **propeptine** n'a été élucidée que par fragmentation par MS/MS et digestion par la trypsine²³³, ce qui a permis d'identifier le cycle macrolactame. En outre, en comparant la séquence de l'anantine et de RES-701-1, les auteurs ont postulé que ce peptide était aussi structuré en lasso.

Par la suite, les structures de deux autres peptides de classe II ont été élucidées, il s'agit de la **lariatine A**¹⁵³ ainsi que de la **capistruine**¹⁵⁴. Ces deux peptides présentent une boucle très courte, mais leur queue C-terminale dépasse de cinq résidus le cycle macrolactame et forme un coude à partir de Asn14 pour la lariatine A et de Arg15 pour la capistruine. Cette taille relativement importante de la queue C-terminale de la lariatine A lui permet d'être mobile et de l'empêcher de remonter à travers le cycle. Ce peptide ne possède donc pas de contraintes stériques pour stabiliser sa structure qui paraît plus lâche. En revanche, une étude complémentaire sur la capistruine a montré l'importance des résidus encombrants Arg15 et Phe16 dans la conservation de la structure lasso. En effet, les auteurs ont substitué par mutagenèse dirigée ces deux résidus par une alanine et ont réussi à former un peptide structuré en lasso mais pour lequel, sous l'effet d'un traitement thermique (95 °C), la queue C-terminale « s'échappe » du cycle²⁰⁴.

Enfin, la structure de l'**astexine-1** a été résolue très récemment et présente

les caractéristiques d'un peptide lasso de classe II¹³⁵. Sa séquence est la plus longue des peptides lasso, son cycle est formé par neuf résidus et sa topologie lasso est stabilisée par la présence du résidu Arg19 sous le cycle.

II.3.3.3. Peptide lasso de classe III

L'unique peptide lasso de classe III, **BI-32169** a été caractérisé récemment¹⁵². La première étude du peptide a mis en évidence la présence du cycle macrolactame constitué des huit premiers acides aminés et le pont disulfure établi entre Cys6 située dans le cycle et la Cys19 C-terminale¹⁵¹. Sa caractérisation structurale¹⁵² par RMN et modélisation moléculaire montre que la queue C-terminale s'insère dans le cycle macrolactame définissant bien un peptide lasso appartenant à une nouvelle classe de peptides lasso ne possédant qu'un seul pont disulfure. BI-32169 est le seul peptide dont la structure a aussi été résolue par cristallographie aux rayons X²²⁹, montrant une bonne cohérence des résultats obtenus par RX et par RMN.

Jusqu'à présent l'outil principal de caractérisation structurale des peptides lasso a été la RMN²³⁴ (Tableau 6). Mais cette technique demande une quantité relativement importante de peptide (entre 0,5 et 1 mg) et prend un certain temps d'analyse. Certaines techniques d'investigation de la structure lasso sont également à prendre en compte. Différents auteurs ont ainsi utilisé des techniques comme le CD, la MS/MS ou encore la digestion protéolytique. Récemment, une étude de notre équipe en collaboration avec C. Afonso et J.-C. Tabet (UPMC Paris 6) a montré l'intérêt de l'utilisation de la spectrométrie de masse FT-ICR (« Fourier transform ion cyclotron resonance », FT-ICR-MS) dans l'étude de deux peptides lasso, MccJ25 et la capistruine, comparativement à leurs topoïsomères de synthèse (MccJ25-lcm et capistruine-lcm) possédant le cycle macrolactame mais non-structurés en lasso²³⁵.

Conclusion

Les structures peptidiques compactes se retrouvent dans la grande diversité de l'arbre du vivant. On les retrouve ainsi produites par les procaryotes (lantibiotiques, bactériocines circulaires, peptides lasso des bactéries) et par les

eucaryotes (cyclotides des plantes, défensines circulaires des mammifères, conotoxines des mollusques), et on soupçonne leur existence chez les archées. Leurs activités biologiques variées et généralement cruciales pour l'organisme producteur sont alors renforcées par l'extrême résistance de ces structures aux dégradations diverses, notamment chimiques et protéolytiques.

Parmi ces structures, les peptides lasso font l'objet d'une attention toute particulière du fait de leur structure très originale dans laquelle leur queue C-terminale est piégée par des contraintes stériques ou par des ponts disulfure à l'intérieur d'un cycle macrolactame N-terminal. Cette structure, isolée jusqu'à présent à partir de protéobactéries et d'actinobactéries, est remarquable non seulement par sa stabilité mais aussi par son repliement spatial qui témoigne d'un mécanisme de biosynthèse complexe.

Un de ces peptides lasso, MccJ25, est un peptide antimicrobien dont l'étude ouvre de nombreuses perspectives sur la connaissance à la fois de la biosynthèse et du mécanisme d'action des peptides lasso. Les récentes avancées dans la mise en évidence du rôle des enzymes de maturation ont ainsi montré leurs rôles respectifs ainsi que leur interdépendance *in vivo*. Les modifications de la séquence peptidique de MccJ25 ont distingué deux régions structurales du peptide impliquées dans les deux étapes du mode d'action : (i) l'internalisation du peptide dans la cellule-cible et (ii) l'action intracellulaire ciblant l'ARNpol ou les mitochondries. Par ailleurs, ce peptide promet de nouvelles avancées dans l'utilisation en bio-ingénierie des peptides lasso.

L'exploration des génomes est apparue comme une ouverture vers la découverte de nouveaux représentants de cette famille, comme l'illustre la découverte de nouveaux peptides lasso de classe II. Cependant, cette méthode n'a pas encore été à l'origine de l'isolement de peptides lasso des autres classes.

Matériel et méthodes

I.1. Souches bactériennes

Tableau 7 : Souches bactériennes utilisées dans cette étude

Souche	Utilisation	Origine
<i>E. coli</i> MC4100 Chl ^R	Production de MccJ25	236
<i>E. coli</i> XL10-Gold Kan ^R	Mutagenèse dirigée	Agilent Technologies
<i>Salmonella enterica</i> sp. enterica serotype Enteritidis	Tests d'activité antimicrobienne	158
<i>Streptomyces coelicolor</i> M1154	Production de la svicéucine	237
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	Production de la capistruine	154

I.2. Milieux de culture

I.2.1. Milieux liquides

Luria-Bertani (LB)

Peptone-tryptone	10 g.L ⁻¹
Extrait de levure	5 g.L ⁻¹
NaCl	10 g.L ⁻¹

M20

Acide glutamique	20 g.L ⁻¹
L-alanine	0,2 g.L ⁻¹
Citrate de sodium.2H ₂ O	1,14 g.L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	17,7 g.L ⁻¹
KCl	0,5 g.L ⁻¹
Na ₂ SO ₄	0,5 g.L ⁻¹
MgCl.6H ₂ O	0,2 g.L ⁻¹
CaCl.2H ₂ O	7,6 mg.L ⁻¹
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .7H ₂ O	15 mg.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	7,6 mg.L ⁻¹
pH	7

Poor broth (PB)

Bactotryptone	10 g.L ⁻¹
NaCl	5 g.L ⁻¹

M63

KH ₂ PO ₄	13,6 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g.L ⁻¹
Hydrolysats de caséine	1 g.L ⁻¹
pH	7

M65

Glucose	4 g.L ⁻¹
Extrait de levure	4 g.L ⁻¹
Extrait de malt	10 g.L ⁻¹
CaCO ₃	2 g.L ⁻¹
pH	7,2

I.2.2. Milieux solides

Les milieux solides gélosés sont constitués à partir des milieux liquides auxquels sont ajoutés 15 g.L⁻¹ d'agar pour une gélose solide et 6,5 g.L⁻¹ pour une gélose molle.

I.3. Plasmides**Tableau 8 : Plasmides utilisés dans cette étude**

Plasmide	Description	Origine
pTUC202	Possède le système génétique de MccJ25 ; production de MccJ25	¹⁶⁵
pTUC202 <i>mcjA</i> F56S	<i>mcjA</i> [F56S] muté	²³⁸ ; cette étude
pTUC202 <i>mcjA</i> Y57I	<i>mcjA</i> [Y57I] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> G58Y	<i>mcjA</i> [G58Y] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> G58R	<i>mcjA</i> [G58R] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> G58K	<i>mcjA</i> [G58K] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> G58D	<i>mcjA</i> [G58D] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> G58E	<i>mcjA</i> [G58E] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> G58N	<i>mcjA</i> [G58N] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> G58V	<i>mcjA</i> [G58V] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> insA_42-43	<i>mcjA</i> [insA_42-43] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> ΔG49-G51	<i>mcjA</i> [ΔG49-G51] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> ΔF47-V48	<i>mcjA</i> [ΔF47-V48] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> ΔG58	<i>mcjA</i> [ΔG58] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> insG59	<i>mcjA</i> [insG59] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> insD59	<i>mcjA</i> [insD59] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> insF59	<i>mcjA</i> [insF59] muté	
pTUC202 <i>mcjA</i> insF59-N60	<i>mcjA</i> [insF59-N60] muté	
pWED4	Possède le système génétique de la svicéucine	cette étude

I.4. Transformation des bactéries

La transformation des bactéries ainsi que la mutagenèse dirigée ont été réalisées en collaboration avec Kok-Phen Yan qui a soutenu sa thèse au laboratoire en novembre 2011.

I.4.1. Préparation des cellules compétentes chimiquement et transformation

200 mL de milieu LB ont été inoculés par 2 mL d'une pré-culture d'une souche *E. coli* ayant poussé une nuit et incubés à 37 °C sous agitation (180 rpm) jusqu'à atteindre une densité optique à 620 nm (DO_{620}) de 0,2-0,4. La culture a été refroidie sur glace pendant 15 min et les cellules ont été récoltées par centrifugation (4 000 rpm) pendant 10 min à 4 °C (rotor JA10, Beckman Coulters). Le culot cellulaire a été resuspendu dans 200 mL d'une solution préalablement refroidie de 0,1 M $CaCl_2$, laissé sur glace pendant 30 min et à nouveau centrifugé à 4 000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Le culot récupéré a ensuite été resuspendu dans 2 mL d'une solution 0,1 M $CaCl_2$ + 10 % glycérol, séparé en aliquots de 100 μ L dans des microtubes, gelé dans du diazote liquide et conservé à -80 °C jusqu'à utilisation.

1 μ L du plasmide d'intérêt a été ajouté aux cellules compétentes préalablement décongelées sur glace. Après 20 min d'incubation sur glace, les cellules ont été soumises à un choc thermique à 42 °C pendant 1 min, refroidies 5 min sur glace et incubées pendant 1 h à 37 °C sous agitation à 180 rpm après ajout de 0,5 mL de LB. Les cellules transformées ont ensuite été déposées sur une plaque de gélose LB contenant les antibiotiques appropriés et incubées à 37 °C sur la nuit.

I.4.2. Préparation des cellules électro-compétentes et électroporation

200 mL de milieu LB ont été inoculés par 2 mL d'une pré-culture d'une souche *E. coli* ayant poussé une nuit et incubés à 37 °C sous agitation (180 rpm) jusqu'à atteindre une DO_{620} de 0,6. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 4 000 rpm pendant 10 min à 4 °C (rotor JA10, Beckman Coulters), lavées (resuspension suivies d'une centrifugation à 4 000 rpm pendant 10 min à 4 °C) avec 200 mL puis 2 fois 40 mL d'une solution préalablement refroidie de 10 % glycérol.

Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 2 mL 10 % glycérol, séparées en aliquots de 100 μ L dans des microtubes, gelées dans du diazote liquide et conservées à -80 °C jusqu'à utilisation.

1 μ L du plasmide d'intérêt a été ajouté aux cellules compétentes préalablement décongelées sur glace. Les cellules ont été électroporées dans une cuvette (puits de 1 mm, Bulldog Bio) à 1250 V (Electroporator 2510, Eppendorf), incubées 1 h à 37 °C sous agitation à 180 rpm après ajout de 0,5 mL LB. Les cellules transformées ont été déposées sur une plaque de gélose LB contenant les antibiotiques appropriés et incubées une nuit à 37 °C.

I.5. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée sur le gène *mcjA* codant le précurseur de MccJ25, McjA, a été réalisée sur le plasmide pTUC202 à l'aide du kit Quick-Change II XL (Agilent) en suivant les instructions du fournisseur. Les réactions de PCR ont été effectuées à l'aide d'une ADN polymérase PfuUltra[®] High Fidelity dans un appareil Eppendorf MasterCycler (Eppendorf) selon le programme suivant :

- dénaturation initiale : 95 °C pendant 1 min
- hybridation : 18 cycles de 50 s à 95 °C, 50 s à 60 °C, 10 min à 68 °C
- élongation finale : 7 min à 68 °C

Les produits de PCR ont été traités par l'enzyme de restriction DpnI (Fermentas) pendant 1 h à 37 °C et utilisés dans la transformation des cellules résistantes à la kanamycine et ultra-compétentes *E. coli* XL10-Gold. Les sites mutés ont été confirmés par séquençage ADN (Eurofins MWG Operon).

II. Expression et production des peptides

II.1. MccJ25 et ses variants

II.1.1. Production

La souche *E. coli* MC4100 possédant le plasmide pTUC202 WT ou muté a été incubée pendant 8 h à 37 °C sous agitation dans 10 mL de milieu LB additionné

de 34 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de chloramphénicol (Cm). 1 L de milieu M63 complété par 10 mL de glucose 20 % (m/v), 40 $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ de MgSO_4 , 34 $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ de Cm et 200 $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ de Vitamine B1, a ensuite été inoculé par un volume nécessaire de cette pré-culture afin d'atteindre une densité optique à DO_{620} de 0,01 (Spectromètre S1200 Spectrawave, Biochrom WPA) et incubé 16 h à 37 °C sous agitation.

II.1.2. Isolement et purification

Les cultures ont été centrifugées à 8 000 g pendant 15 min et les surnageants récoltés ont été pré-purifiés par extraction sur phase solide (SPE) sur des cartouches SepPak C₈ 35 cc (Waters). La cartouche a été conditionnée successivement par trois volumes de méthanol (MeOH), d'acétonitrile (ACN) et cinq volumes d'eau + 0,1 % d'acide formique (AF) avant le chargement du surnageant. Après lavage par de l'eau + 0,1 % AF, les peptides ont été élués successivement par 20 %, 30 % et 40 % ACN dans de l'eau + 0,1 % AF en mesurant l'absorbance à 226 nm.

Les fractions SPE ont été lyophilisées (lyophilisateur Heto PowerDry LL1500, Thermo Electron Corp.) et concentrées dans un volume plus petit du solvant correspondant à chaque fraction. Elles ont ensuite été injectées sur colonne HPLC semi-préparative en phase inverse Capcell C₁₈ (7 x 300 mm, 120 Å, 5 μm , Interchim) et éluées à 2 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$ en appliquant le gradient suivant d'eau + 0,1 % AF (solvant A) et d'ACN + 0,1 % AF (solvent B) :

- augmentation linéaire de 0 % B à 60 % B en 30 minutes
- augmentation linéaire de 60 % B à 100 % B en 5 minutes
- retour à 0 % B en 5 minutes

Les quantités de chaque peptide purifié ont été mesurées par HPLC avec une mesure d'absorbance à 226 nm en utilisant une solution étalon de MccJ25 comme référence. Les peptides ont finalement été séchés sous vide (SpeedVac, Savant) et conservés à -20 °C.

II.2. Svicéucine

II.2.1. Production

La souche *S. coelicolor* M1154 possédant le plasmide pWED4 WT a été incubée dans 5 x 50 mL de milieu M65 48 h à 30 °C sous agitation. 3 L de M65 répartis en 4 x 500 mL et 5 x 200 mL ont étéensemencés par cette pré-culture à raison de 10 mL de pré-culture pour 200 mL de culture et incubés 96 h à 30 °C sous agitation.

II.2.2. Isolement et purification

Les cultures ont été centrifugées 20 minutes à 8 000 g à 4 °C, les culots ont été récupérés et conservés à -20 °C et les surnageants ont été pré-purifiés par SPE en phase inverse sur cartouche SepPak C₈ 35 cc (Waters). La cartouche a été conditionnée successivement par trois volumes de MeOH, d'ACN et cinq volumes d'eau + 0,1 % AF avant le chargement du surnageant. Après lavage par de l'eau + 0,1 % AF, les peptides ont été élués successivement par 20 %, 40 %, 60 % et 80 % ACN dans de l'eau + 0,1 % AF en mesurant l'absorbance à 226 nm.

Les fractions SPE contenant le peptide ont été rassemblées, lyophilisées (lyophilisateur Heto PowerDry LL1500, Thermo Electron Corp.) et concentrées dans un volume plus petit du solvant correspondant à la fraction. Elles ont ensuite été injectées sur colonne HPLC semi-préparative en phase inverse Capcell C₁₈ (7 x 300 mm, 120 Å, 5 µm, Interchim) et éluées à 2 mL.min⁻¹ en appliquant le gradient suivant d'eau + 0,1 % AF (solvant A) et d'ACN + 0,1 % AF (solvant B) :

- isocratique de 10 % B pendant 5 minutes
- augmentation linéaire de 10 % B à 60 % B en 20 minutes
- isocratique de 60 % B pendant 5 minutes
- retour à 10 % B en 2 minutes

Le peptide purifié a été séché sous vide (SpeedVac, Savant), pesé et conservé à -20 °C.

II.2.3. Réduction-alkylation de la svicéucine

La sviceucine a été solubilisée dans une solution de 6 M d'hydrochloride de guanidinium dans l'eau (concentration en peptide de 480 μM dans un volume de 500 μL). Après ajout de dithiothréitol (DTT) à une concentration finale de 20 mM, le peptide a été incubé pendant 1 h à 37 °C ou 10 minutes à 95 °C. L'alkylation des cystéines réduites a été réalisée par S-pyridylethylation²³⁹. 0,5 μL de 4-vinylpyridine (4-VP) a été ajouté à la solution de peptide réduit (concentration finale 10 mM), et la solution a été incubée pendant 1 h à 37 °C. La réduction a été suivie par LC-MS. La séparation a été réalisée sur une colonne Strategy C₁₈-2 (150 × 1 mm, 5 μm , Interchim), avec un débit de 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ et un gradient d'eau + 0,1 % AF (solvant A) et d'ACN (solvant B) avec une augmentation linéaire de 0 % B à 60 % B en 30 minutes. L'analyse par spectrométrie de masse a été conduite en mode positif, dans la gamme de m/z 250 – 1500. Les peptides réduits et alkylés ont été purifiés par HPLC de phase inverse, sur une chaîne analytique U3000 (Dionex), avec un suivi de l'absorbance à 226 nm. La séparation a été réalisée à un débit de 1 mL/min sur une colonne Uptisphere C₁₈ (ODSB) de dimensions 250 × 4,6 mm et de granulométrie 5 μm (Interchim), en deux étapes. La première étape a été réalisée avec un gradient d'eau + 0,1 % AF (solvant A) et d'ACN (solvant B) avec une augmentation linéaire de 0 % B à 60 % B en 30 minutes. La seconde étape a été réalisée en mode isocratique sous 35 % B.

II.3. Capistruine

II.3.1. Production

La souche *Burkholderia thailandensis* E264 a été incubée dans 10 mL LB additionné de gentamycine 8 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ 12 h à 37 °C sous agitation. 1 L de milieu M20 a étéensemencé par cette pré-culture additionnée de gentamycine 8 $\text{mg}.\text{L}^{-1}$ et incubé 24 h à 42 °C sous agitation.

II.3.2. Isolement et purification

La culture a été centrifugée 15 minutes à 10 000 g à 4 °C et le surnageant a

été pré-purifié par SPE en phase inverse sur cartouche SepPak C₈ 35 cc (Waters). La cartouche a été conditionnée successivement par trois volumes de MeOH, d'ACN et cinq volumes d'eau + 0,1 % AF avant le chargement du surnageant. Après lavage par de l'eau + 0,1 % AF, les peptides ont été élués successivement par 20 %, 40 %, 60 % et 80 % ACN dans de l'eau + 0,1 % AF en mesurant l'absorbance à 226 nm.

Les fractions SPE contenant le peptide ont été rassemblées, lyophilisées (lyophilisateur Heto PowerDry LL1500, Thermo Electron Corp.) et concentrées dans un volume plus petit du solvant correspondant à la fraction. Elles ont ensuite été injectées sur colonne HPLC semi-préparative en phase inverse Capcell C₁₈ (7 x 300 mm, 120 Å, 5 µm, Interchim) et éluées à 2 mL.min⁻¹ en appliquant le gradient suivant d'eau + 0,1 % AF (solvant A) et d'ACN + 0,1 % FA (solvant B) :

- augmentation linéaire de 0 % B à 30 % B pendant 30 minutes
- augmentation linéaire de 30 % B à 100 % B en 2,5 minutes
- retour à 0 % B en 2,5 minutes

Le peptide purifié a été séché sous vide (SpeedVac, Savant), pesé et conservé à -20 °C.

III. Activité biologique des peptides

III.1. Milieu solide

L'activité antibactérienne de MccJ25 et de ses variants a été testée sur la souche productrice *E. coli* MC4100 comme contrôle négatif et la souche sensible *S. enterica* sp. *enterica* serotype Enteritidis à l'aide de la méthode de diffusion sur gélose. 5 mL de gélose molle M63 ont été inoculés par 10⁶ CFU de bactéries et déposés en boîte de Petri. Après refroidissement, 10 µL des fractions SPE (brutes ou concentrées) ou du peptide purifié (~ 30 µM) ont été déposés. Les boîtes de Petri ont été incubées une nuit à 37 °C et l'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre d'inhibition de la culture au niveau du dépôt.

III.2. Milieu liquide (CMI)

L'activité antibactérienne en milieu liquide a été mesurée en mesurant la

concentration minimale inhibitrice de la croissance bactérienne en milieu PB. Une culture de bactérie en phase exponentielle de croissance (DO_{620} entre 0,3 et 0,4) a été diluée dans du PB à une DO_{620} de 0,001. 90 μL de la culture diluée ont été introduits dans une microplaque 96 puits et 10 μL des dilutions successives de MccJ25 et de ses variants [G21X] (X = R, K, D, E, N) y ont été ajoutés. Chaque dilution a été testée trois fois. Les plaques ont été incubées 16 h à 37 °C sous agitation et l'absorbance à 620 nm a été mesurée avec un lecteur de microplaques Multiskan FC (Thermo Scientific). Les CMI ont été déterminées comme la plus petite concentration en peptide inhibant complètement la croissance bactérienne.

IV. Caractérisation structurale des peptides

IV.1. Digestion enzymatique de MccJ25 et de ses variants

IV.1.1. Thermolysine

Les peptides purifiés (2 mg) ont été solubilisés dans un tampon de digestion composé de 600 μL NH_4HCO_3 0,17 M et 200 μL CaCl_2 10 mM. Après ajout de 40 μg de thermolysine (*Bacillus thermoproteolyticus*, Boehringer Mannheim), les peptides ont été incubés 1 h à 46 °C sous agitation. La réaction a été arrêtée en ajoutant 400 μL d'acide acétique glaciale. Les peptides digérés ont été conservés à -20 °C avant d'être analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS).

Les fragments de digestion ont été identifiés d'après leur m/z en utilisant le logiciel en ligne FindPept (<http://web.expasy.org/findpept/>) et analysés par LC-MS/MS en tandem le cas échéant.

IV.1.2. Carboxypeptidase Y

Les fractions SPE ou les peptides purifiés (0,5 mg.mL^{-1}) ont été dilués 4 fois dans un volume final 200 μL de tampon pyridine acétate 0,1 M, pH 5,6 et incubés à 26,5 °C sous agitation en absence ou en présence de carboxypeptidase Y (*Saccharomyces cerevisiae*, Sigma-Aldrich) à 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Deux réactions de

digestions ont été réalisées pour chaque peptide : la première a été stoppée après 1 min et la deuxième après 3 h de digestion par ajout de 20 μ L d'acide acétique glacial. Les peptides digérés ont été conservés à -20 °C avant d'être analysés par LC-MS.

IV.2. Etude conformationnelle par dichroïsme circulaire (CD)

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Patrizia Alberti de l'unité Régulations et Dynamique des génomes (UMR 7296 CNRS/MNHN – INSERM U565) dirigée par Carine Giovannangeli.

IV.2.1. Principe du CD

Le CD est une méthode spectroscopique rapide et sensible afin de déterminer les structures secondaires des structures protéiques²⁴⁰. La méthode consiste à faire traverser l'échantillon par un faisceau de lumière polarisée et à mesurer la différence entre la composante gauche et droite de l'absorbance des composés polarisés circulairement :

$$\Delta A = A_G - A_D$$

Plus généralement, on utilise l'ellipticité molaire :

$$[\theta] = \frac{32,98 \times \Delta A}{[\text{composé}]}$$

exprimée en $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$, ce qui permet de s'affranchir de la concentration du composé étudié.

Dans le cadre des protéines et des peptides, le spectre CD enregistré sous les 240 nm fournit de précieux renseignements sur la structure secondaire de la molécule (Figure 35). Ainsi, les hélices α présentent un maximum positif intense centrée sur 190 nm et un double minimum négatif à 210 et 220 nm ; les feuillets β anti-parallèles un maximum vers 190-220 nm et un minimum vers 210 nm ; les « β -turn » de type I un maximum vers 205 nm et un faible minimum négatif vers 225 nm ; les hélices 3_{10} et les hélices poly-Pro de type II une faible bande positif vers 210 nm et un minimum vers 190 nm ; enfin, une structure irrégulière ne possède aucun maximum positif dans cette région du spectre.

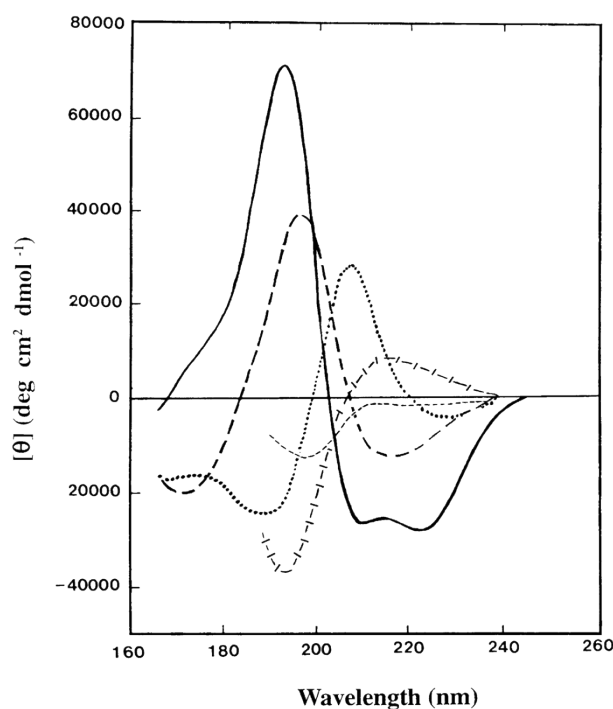


Figure 35 : Spectres CD de l'UV lointain des différents types de structure secondaire d'une protéine. Ligne pleine : hélice α ; ligne hachurée (tirets longs) : feuillet β anti-parallèle ; ligne pointillée : « β -turn » de type I ; ligne avec barres verticales : hélice 3_{10} ou hélice poly-Pro de type II ; ligne hachurée (tirets courts) : structure irrégulière (« random coil »)²⁴⁰.

IV.2.2. Enregistrement des spectres

Les peptides purs ont été solubilisés à une concentration de 500 μM dans MeOH ou dans un mélange MeOH:H₂O 1:1 (v/v). Les spectres CD ont été enregistrés sur un spectropolarimètre Jasco J-810 équipé d'un contrôleur de température à effet Peltier PFD 423 S/L (Jasco) et sous courant d'azote pour éviter la présence d'oxygène de l'air. Les échantillons ont été analysés à 25 °C dans une cuve de quartz de chemin optique 0,05 cm, sur une gamme spectrale de 300 à 190 nm avec une vitesse d'acquisition de 50 nm.min⁻¹, et une résolution de 0,1 nm. Pour chaque échantillon, trois spectres, auxquels la ligne de base a été soustraite, ont été accumulés et moyennés afin de donner le spectre d'étude qui a été converti en ellipticité molaire par résidu ($[\theta]$) en deg.cm².dmol⁻¹.

IV.3. Etude par spectrométrie de masse (MS)

Cette étude a été réalisée au sein de la plateforme de spectrométrie de masse du MNHN.

IV.3.1. Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice couplée à un analyseur « temps de vol » (MALDI-TOF)

1 μL de chaque échantillon a été déposé sur une plaque MALDI entre une couche de 0,5 μL de matrice acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) solubilisée dans de l'acétone et une couche de 1 μL de matrice HCCA en solution dans 70 % ACN/30 % eau + 1 % AF. Les expériences ont été effectuées sur un spectromètre de masse Voyager DE Pro (Applied Biosystems) en mode linéaire ou réflectron positif, avec une tension d'accélération de 22 kV. Les spectres ont été calibrés à l'aide d'un calibrant externe composé d'un mélange de peptides de masse étalon (Sequazyme Peptide Mass Calibration Mixture 1 et 2, Applied Biosystems).

IV.3.2. Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS)

L'analyse LC-MS des peptides a été effectuée sur une chaîne Dionex U3000 Micro reliée à un spectromètre de masse Q-Star Pulsar (Applied Biosystems) à source d'ionisation par électrobulbion avec un analyseur par « temps de vol » quadripolaire (ESI-Qq-TOF).

La séparation chromatographique des peptides a été réalisée sur une colonne de phase inverse Agilent Zorbax 300 SB C₈ (1 x 150 mm, 300 Å, 3,5 μm , Agilent). La phase mobile A est composée d'eau + 0,1 % FA et la phase B éluante est constituée d'acétonitrile à un débit de 40 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Le gradient suivant de solvant B a été appliqué pour l'élution :

- augmentation linéaire de 0 % B à 60 % B en 30 min
- augmentation linéaire de 60 % B à 100 % B en 2 min
- retour à 0 % B en 2 min

Les expériences en mode MS ou MS/MS ont été réalisées en mode positif avec une tension d'accélération de 3500 V. Les ions ont été détectés dans une gamme de rapport m/z compris entre 250 et 1300. Dans le cadre des expériences LC-MS/MS, la dissociation induite par collision (CID) des ions doublement ou triplement chargés des peptides d'intérêt a été réalisée avec une tension d'excitation comprise entre 22,5 et 60 V.

IV.4. Etude structurale de peptides par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Cette étude a été effectuée en collaboration avec Ewen Lescop et Eric Guittet au Laboratoire de Chimie et de Biologie Structurales de l'Institut de Chimie des Substances Naturelle de Gif-sur-Yvette.

IV.4.1. Instrumentation

Trois spectromètres ont été utilisés pour enregistrer les spectres des peptides :

- un spectromètre Bruker Biospin AVANCE 400 MHz équipé d'une tête de mesure inverse (BBI) large bande avec gradient Z $^1\text{H}/\text{X}$
- un spectromètre Bruker AVANCE II 600 MHz équipé d'une cryosonde avec gradient Z à triple résonance $^1\text{H}-^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ TCI
- un spectromètre Bruker AVANCE III 950 MHz équipé d'une cryosonde avec gradient Z à triple résonance $^1\text{H}-^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ TCI

IV.4.2. Séquences RMN à deux dimensions (2D) utilisées

Les différentes séquences RMN 2D utilisées dans cette étude comportent trois intervalles de temps : la préparation, l'évolution et la détection (ou acquisition). L'application d'une double transformée de Fourier permet d'obtenir un spectre à deux dimensions sur lequel apparaît des pics (représentés en courbes de niveaux d'intensité) aux fréquences de résonance des noyaux en corrélation.

IV.4.2.1. Suppression du signal du solvant

Pour les expériences enregistrées dans $d_3\text{-MeOH}$ et H_2O , le signal des protons hydroxyles de ces deux solvants saturent le spectre. On utilise alors préférentiellement trois méthodes afin de le supprimer : la présaturation, la séquence WATERGATE²⁴¹ et la technique appelée « excitation sculpting »²⁴².

La présaturation du signal du solvant est la technique la plus courante parce que très simple à appliquer et relativement efficace. Elle consiste à appliquer

durant le délai de relaxation t_{rd} une irradiation sélective à la fréquence du signal du proton hydroxyle à supprimer. Les principaux inconvénients de cette technique sont, d'une part, que les signaux qui résonnent à une fréquence proche du signal du solvant (principalement les H_a) peuvent aussi être saturés et, d'autre part, que le transfert de saturation peuvent partiellement saturer les spins des protons échangeables.

Afin d'éviter ces défauts, la séquence WATERGATE binomiale (Figure 36) a été développée plus récemment. Après une impulsion non-sélective initiale, un gradient déphase à la fois les spins des protons du solvant et du soluté. Une impulsion à 180° binomiale de type 3-9-19 sélective ne touche pas à l'aimantation des protons du solvant. Ce qui permet de conserver tous les signaux du spectre qui ont subi cette impulsion alors que ceux des protons du solvant sont défocalisés et donc éliminés.

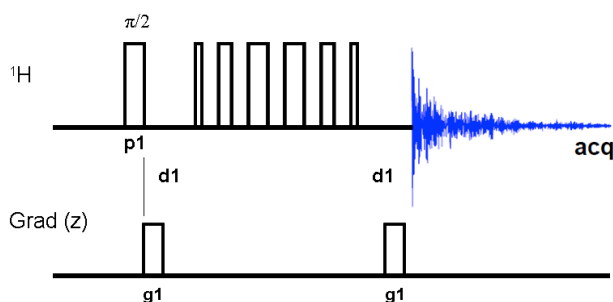


Figure 36 : Séquence d'impulsions WATERGATE binomiale 3-9-19.

Une meilleure suppression du signal de solvant peut être obtenue en utilisant une technique d'écho de double gradient appelée « excitation sculpting » dont une séquence possible est représentée sur la Figure 37. Le principe de cette technique est similaire à la WATERGATE binomiale et consiste à défocaliser les spins des protons du solvant.

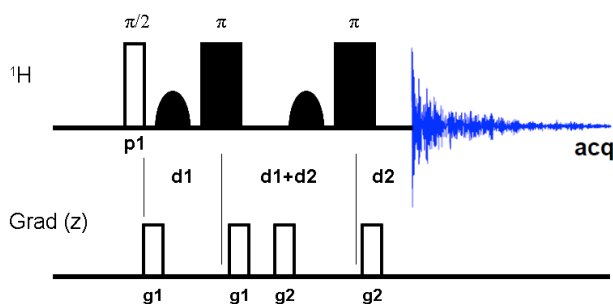


Figure 37 : Séquence d'impulsions excitation sculpting.

IV.4.2.2. COrrrelation SpectroscopY (COSY)

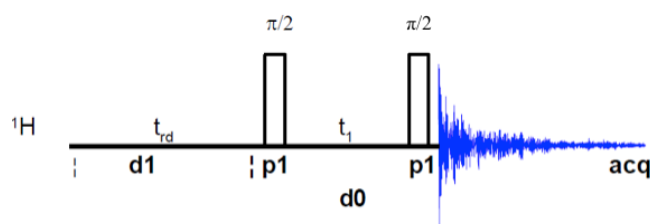


Figure 38 : Séquence d'impulsions COSY.

L'expérience de spectroscopie de corrélation COSY²⁴³ est la première expérience de RMN bidimensionnelle à avoir été développée et continue à être utilisée dans l'étude des peptides et des petites protéines. La séquence d'impulsions (Figure 38) consiste en deux impulsions séparées par un délai incrémenté t_1 . Elle permet de mettre en évidence les couplages scalaires entre protons géminés (2J) et vicinaux (3J). Souvent, les spectres COSY sont alourdis par la présence sur la diagonale de taches associées aux spins dépourvus de couplage. Afin d'éviter cela, nous pouvons utiliser l'expérience COSY-DQF.

IV.4.2.3. Double-Quantum Filtered COrrrelation SpectroscopY (COSY-DQF)

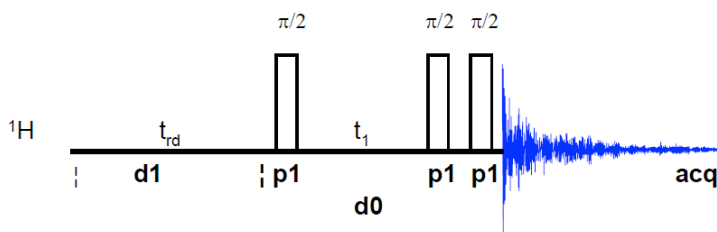


Figure 39 : Séquence d'impulsions COSY-DQF.

L'expérience COSY-DQF^{244,245} est la plus simple de la famille des expériences basées sur la filtration d'un état « multiple-quantum » et fournit des simplifications du spectre COSY intéressantes notamment à proximité de la diagonale. Sa séquence d'impulsion contient une impulsion à 90° de plus immédiatement après la dernière impulsion de la séquence COSY. Celle-ci a pour effet d'éliminer les cohérences « simple-quantum » des noyaux non couplés et donc de simplifier le signal proche de la diagonale. Les informations d'un spectre COSY-DQF sont essentiellement les mêmes que celles d'un spectre COSY sauf qu'il est

possible d'en extraire la constante de couplage entre deux protons corrélés.

IV.4.2.4. T^OTal C^Orrelation S^Pectroscop^Y (TOCSY)

Les expériences COSY ne permettent toutefois pas d'obtenir les corrélations entre tous les protons d'un même système de spins, il a donc été mis au point une autre méthode permettant d'obtenir ces informations, c'est l'expérience TOCSY²⁴⁶. Au cours de cette expérience, l'aimantation peut être transférée sans perte d'énergie à travers plusieurs couplages en appliquant durant un temps τ_m un verrouillage de spin (« spin-lock »), et, en l'absence de relaxation, des pics de corrélation sont générés entre les résonances d'un même système de spins.

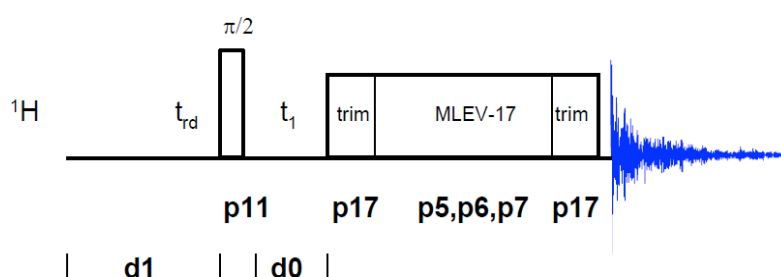


Figure 40 : Séquence d'impulsions TOCSY MLEV-17.

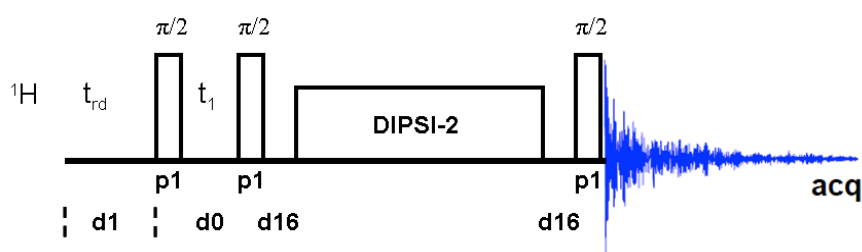


Figure 41 : Séquence d'impulsions TOCSY DIPSI-2.

Il existe plusieurs séquences d'impulsions pour le spin-lock et les deux que nous avons utilisées au cours de cette étude sont MLEV-17²⁴⁷ (Figure 40) et DIPSI-2²⁴⁸ (Figure 41).

IV.4.2.5. N^Uclear O^Uverhauser E^Uffect S^Pectroscop^Y (NOESY)

Les expériences de RMN 2D que nous avons décrites jusqu'à maintenant ne concernaient que le couplage scalaire entre protons et ne donnaient uniquement accès qu'aux corrélations entre protons d'un même acide aminé mais

l'utilisation de la relaxation croisée dipôle-dipôle permet de corréler des spins de protons proches dans l'espace. L'utilisation de la relaxation croisée longitudinale est l'objet de l'expérience NOESY²⁴⁹ basée sur l'effet Overhauser nucléaire qui est la manifestation que des spins couplés de manière dipolaire ne relaxent pas indépendamment l'un de l'autre.

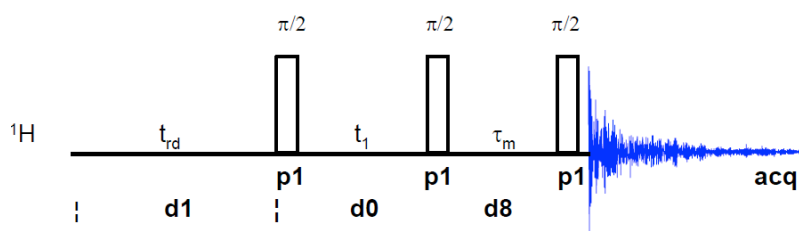


Figure 42 : Séquence d'impulsions NOESY.

La séquence d'impulsions NOESY (Figure 42) fait intervenir deux impulsions à 90° séparées de t_1 suivies d'une période τ_m durant laquelle le transfert d'aimantation par couplage dipolaire a lieu et se termine par une impulsion à 90° qui permet d'observer l'aimantation transverse.

Les spectres NOESY fournissent d'importantes données sur la conformation des molécules en solution. Le fait que deux protons ne peuvent corréler ensemble que s'ils sont éloignés de moins de 5 Å dans l'espace permet de restreindre les possibilités de conformation de la protéine ou du peptide. De plus, l'importance du NOE entre deux protons est inversement proportionnelle à la distance qui les séparent, ce qui est utilisé dans la modélisation moléculaire sous contraintes RMN (voir IV.5).

IV.4.2.6. Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy (ROESY)

L'expérience ROESY²⁵⁰ utilise un phénomène analogue à l'effet Overhauser nucléaire si ce n'est qu'on regarde maintenant la relaxation croisée entre deux spins qui ont été préalablement verrouillés par l'application d'impulsions rf (Figure 43). Dans cette expérience, les effets Overhauser sont positifs quelque soit le temps de corrélation rotationnel de la molécule. On observera donc des ROEs pour toutes les tailles de molécule, mais toutefois, avec une intensité maximale inférieure à celle du NOESY.

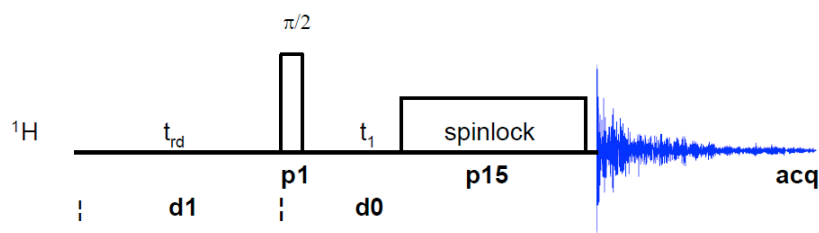


Figure 43 : Séquence d'impulsions ROESY.

Cependant, on pourra aussi observer des taches TOCSY sur un spectre ROESY dues à un transfert d'aimantation par un couplage scalaire, ce qui induit une perte de fiabilité dans la mesure de l'intensité ROE.

IV.4.2.7. Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC)

Les méthodes RMN ^1H 2D qui viennent d'être décrites peuvent s'avérer insuffisantes dans l'étude d'un peptide ou d'une protéine puisque le nombre d'atomes d'hydrogènes augmente de manière linéaire avec la masse de la molécule. Les expériences RMN 2D de corrélation hétéronucléaire permettent soit de s'affranchir du problème posé par l'augmentation du nombre de protons dans les grosses molécules, soit d'obtenir des informations plus précises sur l'identification de chaque résidu d'un peptide ou sur la conformation de la molécule. Grâce à l'utilisation de spectromètres à très hauts champs (800 et 950 MHz), l'abondance naturelle en isotope ^{13}C et ^{15}N est suffisante pour effectuer ces méthodes sur du matériel peptidique non-marqué.

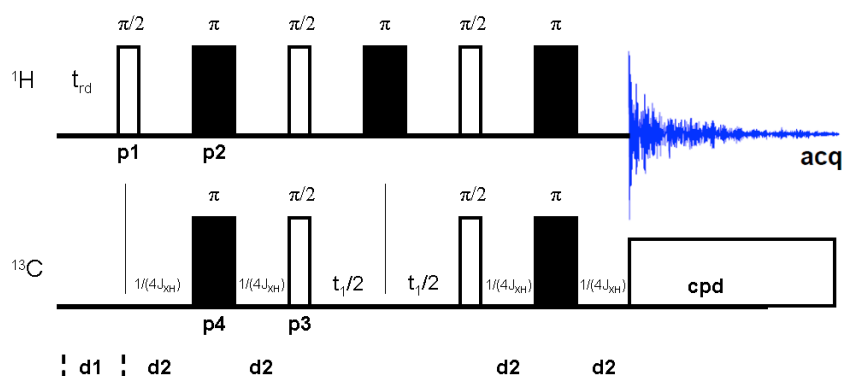


Figure 44 : Séquence d'impulsion HSQC.

L'expérience HSQC²⁵¹ (Figure 44) permet de mettre en évidence les couplages $^1J_{\text{XH}}$ ($\text{X} = ^{13}\text{C}$ ou ^{15}N) et d'attribuer les carbones et les azotes qui portent

les protons attribués par RMN 2D ^1H ou d'identifier plus précisément les protons amides de chaque résidu.

IV.4.2.8. Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (HMBC)

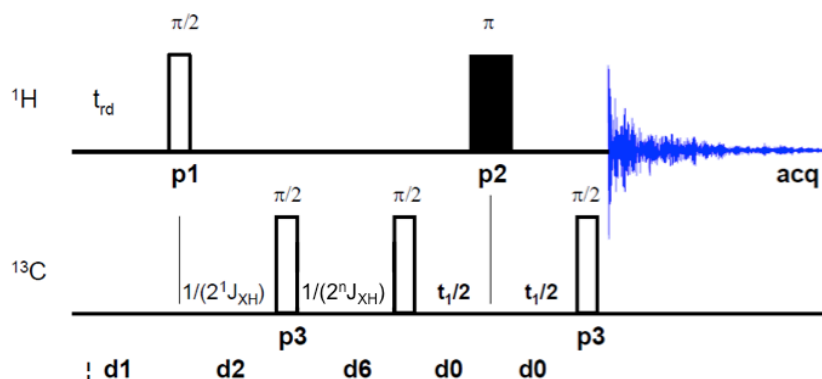


Figure 45 : Séquence d'impulsions HMBC.

L'expérience HMBC²⁵² donne accès, sur le même principe que l'expérience HSQC, aux couplages scalaires $^2J_{\text{XH}}$ et $^3J_{\text{XH}}$ et met en évidence les corrélations longue distance entre protons et carbones (et parfois entre protons et azotes). Afin d'éliminer les couplages $^1J_{\text{XH}}$, on impose un filtre par le biais du délai d_2 (Figure 45).

IV.4.3. MccJ25 et ses variants

IV.4.3.1. Préparation des échantillons

Les échantillons ont été analysés dans des tubes RMN Norell S-5-600-7 de 5 mm. MccJ25 et les variants MccJ25[G21D] et MccJ25[G21R] ont été dilués à une concentration de 1 mM dans d_3 -MeOH. Le variant MccJ25[insA], insoluble dans MeOH, a été dissous à 2 mM dans d_6 -DMSO. Afin de comparer les déplacements chimiques de ce variant avec ceux du peptide sauvage, MccJ25 a aussi été dissous à 2 mM dans d_6 -DMSO.

IV.4.3.2. Calibration des spectres

Les spectres ont été calibrés sur la raie centrale du quintuplet du d_3 -MeOH ou du d_6 -DMSO, selon l'échantillon, en prenant respectivement comme déplacement chimique 3,31 ppm et 2,49 ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS).

IV.4.3.3. Séquences utilisées et paramètres d'acquisition

Tableau 9 : Expériences RMN réalisées dans le cadre de l'étude de la structure de MccJ25 et de ses variants.

Peptide	Solvant	Champ (MHz)	T (K)	Expériences
MccJ25	d_3 -MeOH	600,13	293	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 120$ ms)
			298	1D ^1H COSY TOCSY ($\tau_m = 120$ ms) NOESY ($\tau_m = 200$ ms) HSQC ^{13}C , HMBC ^{13}C
	d_6 -DMSO	400,13	298	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 120$ ms) NOESY ($\tau_m = 300$ ms)
MccJ25[G21D]	d_3 -MeOH	600,13	298	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 120$ ms) NOESY ($\tau_m = 80, 200$ ms) HSQC ^{15}N
MccJ25[G21R]	d_3 -MeOH	600,13	288	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 120$ ms) NOESY ($\tau_m = 80, 200$ ms)
			298	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 120$ ms) NOESY ($\tau_m = 80, 200$ ms) HSQC ^{15}N
MccJ25[insA]	d_6 -DMSO	400,13	298	1D ^1H COSY TOCSY ($\tau_m = 120$ ms) NOESY ($\tau_m = 300$ ms) HMBC ^{13}C

IV.4.3.4. Analyse des spectres

Après avoir été transformés et calibrés avec le logiciel TopSpin 2.1 (Bruker), les spectres ont été analysés à partir de la suite de logiciels CcpNmr Analysis²⁵³ installée sur un système Linux.

IV.4.4. Svicéucine

IV.4.4.1. Préparation des échantillons

Les échantillons de svicéucine ont été analysés dans des tubes RMN Norell S-5-600-7 de 5 mm. La svicéucine a été diluée à 2,4 μM dans d_3 -MeOH ou de d_6 -DMSO, et à 0,8 μM dans H_2O comprenant 10 % de D_2O . Le pH de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ a été ajusté à 4,7 par HCl/NaOH.

IV.4.4.2. Calibration des spectres

Les spectres en milieu organique ont été calibrés sur la raie centrale du quintuplet du d_3 -MeOH ou du d_6 -DMSO en prenant respectivement comme déplacement chimique 3,31 ppm et 2,49 ppm par rapport au TMS. Dans l'eau, les spectres à 298 K ont été calibrés sur le signal de l'eau à 4,7 ppm.

IV.4.4.3. Séquences utilisées et paramètres d'acquisition

Tableau 10 : Expériences RMN réalisées dans le cadre de la modélisation de svicéucine.

Solvant	Champ (MHz)	T (K)	Expériences
d_3 -MeOH	400,13	298	1D ^1H COSY, COSY-DQF TOCSY ($\tau_m = 90$ ms) NOESY ($\tau_m = 200, 400$ ms) HMBC ^{13}C , HSQC ^{13}C
		283	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 80$ ms) NOESY ($\tau_m = 120$ ms)
	600,13	288	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 80$ ms)
		293	1D ^1H COSY TOCSY ($\tau_m = 80$ ms)
		298	1D ^1H COSY, COSY-DQF TOCSY ($\tau_m = 30, 60, 80, 90$ ms) NOESY ($\tau_m = 50, 80, 150, 200, 300, 500$ ms) ROESY ($\tau_m = 200$ ms) HMBC ^{13}C , HSQC ^{13}C HSQC ^{15}N
		303	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 80$ ms)
		313	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 80$ ms)
		308	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 80$ ms)
		313	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 80$ ms)
		318	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 80$ ms)
	950,13	298	1D ^1H COSY-DQF TOCSY ($\tau_m = 80$ ms) NOESY ($\tau_m = 200, 500, 800$ ms, 1 s)
d_6 -DMSO	400,13	298	1D ^1H TOCSY ($\tau_m = 90$ ms) NOESY ($\tau_m = 300$ ms)
	950,13	298	1D ^1H COSY TOCSY ($\tau_m = 30, 80$ ms) NOESY ($\tau_m = 20, 150, 300$ ms) HSQC ^{13}C

H ₂ O pH = 4,7	400,13	298	1D ¹ H TOCSY (τ_m = 90, 120 ms)
	950,13	278	1D ¹ H TOCSY (τ_m = 30, 80 ms) NOESY (τ_m = 150, 300, 500 ms) HMQC ¹³ C, HSQC ¹³ C
		298	1D ¹ H TOCSY (τ_m = 30, 80 ms) NOESY (τ_m = 300 ms)
		323	1D ¹ H TOCSY (τ_m = 30, 80 ms) NOESY (τ_m = 150, 500 ms) HMQC ¹³ C, HSQC ¹³ C

IV.5. Modélisation moléculaire sous contraintes RMN

La résonance magnétique nucléaire est, avec la cristallographie aux rayons X, la principale méthode pour déterminer la structure tridimensionnelle de molécules comme les peptides et les protéines. L'avantage de la RMN sur la cristallographie consiste dans le fait que l'étude de la molécule se fait en solution et ne nécessite pas de cristalliser le matériel protéique. De plus, avec le développement de spectromètres RMN à très haut champ, les quantités d'échantillons nécessaires ont été grandement diminuées.

La modélisation de la structure tridimensionnelle d'une protéine a été décrite par Wüthrich²⁵⁴ et comporte trois étapes. La première étape, l'attribution séquentielle, consiste à attribuer chaque déplacement chimique aux protons de chaque acide aminé de la protéine ainsi qu'à déterminer la séquence en acide aminé. Puis, il s'agit d'extraire des spectres les paramètres conformationnels de la molécule, notamment les contraintes de distance entre les protons ainsi que les angles dièdres ϕ . Enfin, à partir de la réunion de toutes ces données, un protocole de modélisation moléculaire sous le contrôle de ces contraintes permet de calculer la structure tridimensionnelle de la protéine.

L'ensemble du calcul de la modélisation moléculaire des structures de la svicéucine a été effectuée avec le logiciel X-PLOR^{255–257} et le champ de force CHARMM22, dérivant du champ de force CHARMM²⁵⁸.

IV.5.1. Attribution séquentielle

L'attribution séquentielle d'un peptide comporte elle-même deux étapes dont

la première est la détermination des systèmes de spin ^1H de chaque acide aminé de la molécule. Ceci est effectué grâce aux expériences de RMN ^1H 2D qui permettent de mettre en évidence les couplages scalaires entre protons et donc l'interaction par le biais des liaisons. On utilise pour cela l'expérience COSY qui donnent les couplages entre protons géminés (2J) et vicinaux (3J). Mais parfois, pour des raisons de recouvrement des signaux, celle-ci ne permet pas d'attribuer les protons des systèmes de spin de résidus à longue chaîne latérale, c'est pourquoi on utilise l'expérience TOCSY qui donne accès à toutes les interactions d'un proton avec les autres protons du système de spin par les couplages scalaires ou les transferts d'aimantation.

Une fois l'intégralité des protons de chaque résidu identifiée, il reste à définir l'emplacement de chaque acide aminé dans la séquence du peptide. L'utilisation des expériences de type NOESY ou ROESY, qui procurent des renseignements sur les interactions dipolaires à travers l'espace entre les protons, permet d'identifier les acides aminés voisins. En effet, les protons distants de moins de 5 Å donnent sur les spectres NOESY des taches de corrélations dipolaires. En observant les taches d'interaction entre les protons $\text{H}_\text{N}(\text{i})$ et $\text{H}_\text{N}(\text{i}+1)$ ou $\text{H}_\alpha(\text{i})$ et $\text{H}_\text{N}(\text{i}+1)$, nous pouvons donc remonter la séquence en acide aminé du peptide.

L'attribution séquentielle des protons de la svicéucine a été réalisée à 298 K dans le d_3 -MeOH grâce aux spectres TOCSY ($\tau_m = 30, 80$ et 90 ms) et NOESY ($\tau_m = 50, 80, 150, 200$ et 500 ms) enregistrés à 400, 600 et 950 MHz. Les spectres ont été transformés et calibrés par le logiciel TopSpin 2.1 (Bruker) et analysés avec le logiciel CcpNmr.

IV.5.2. Contraintes de distances NOEs et angles ϕ

Une fois la séquence de la molécule reconstituée, nous pouvons utiliser les informations du spectre NOESY afin d'identifier les protons qui corrélient dans l'espace mais qui n'appartiennent pas à deux résidus voisins dans la séquence du peptide. Les effets Overhauser nucléaire (NOEs) permettent d'obtenir des renseignements sur le rapprochement spatial entre deux acides aminés de la séquence. L'intensité de ces effets entre deux protons étant inversement proportionnelle à la puissance 6 de la distance qui les sépare, nous pouvons établir

la distance r_i entre deux protons qui corrélient par couplage dipolaire selon la formule

$$r_i = r_{ref} \left(\frac{S_{ref}}{S_i} \right)^{1/6}$$

dans laquelle r_{ref} est la distance de référence entre deux protons, S_{ref} l'intensité de la tache de corrélation correspondante et S_i l'intensité de la tache entre les protons d'intérêt.

Le fichier de contraintes de distance NOEs de la svicéucine a été établi sur la base de l'intégration par le logiciel AURELIA (Bruker) du spectre NOESY ($\tau_m = 150$ ms) enregistré à 600 MHz dans d_3 -MeOH, à 298 K. La distance de référence r_{ref} a été fixée à 1,8 Å entre les deux protons géminés H_β de Cys1. Une marge d'erreur de ± 30 % autour de la valeur des distances mesurées expérimentalement a été utilisée dans le protocole de modélisation.

Parallèlement à ce fichier de distances, nous pouvons établir grâce à l'intensité de la constante de couplage scalaire des protons vicinaux $^3J_{HNH\alpha}$ l'angle de torsion ϕ entre les liaisons H_N-N et $H_\alpha-C_\alpha$ selon la relation de Karplus²⁵⁹

$$^3J_{HNH\alpha} = A \cos^2 \theta - B \cos \theta + C$$

avec $\theta = |\phi - 60^\circ|$, l'angle dièdre en degrés. Plusieurs coefficients A , B et C ont été évalués dans la littérature²⁶⁰⁻²⁶⁴. Les coefficients de Pardi sont néanmoins les plus utilisés, la relation de Karplus devient donc

$$^3J_{HNH\alpha} = 6,4 \cos^2 \theta - 1,4 \cos \theta + 1,9$$

Selon la valeur de la constante de couplage mesurée sur les spectres COSY-DQF, nous pouvons donc attribuer une valeur à l'angle dièdre ϕ de la liaison $H_N-N-C_\alpha-H_\alpha$.

Les angles dièdres ϕ de la svicéucine ont été déterminés à partir des constantes $^3J_{HNH\alpha}$ mesurées sur les spectres COSY-DQF enregistrés dans le d_3 -MeOH, à 298 K. Leurs valeurs ont été fixées à $-120^\circ \pm 30^\circ$ pour $^3J_{HNH\alpha} > 9$ Hz et à $-120^\circ \pm 45^\circ$ pour $7,9 \text{ Hz} < ^3J_{HNH\alpha} < 9$ Hz dans le fichier de contraintes angulaires utilisé pour la modélisation moléculaire.

IV.5.3. Détermination des ponts disulfure

La présence de cystéines dans un peptide introduit une difficulté dans la

modélisation de la molécule selon qu'elles soient engagées ou non dans un pont disulfure. Pour lever cet obstacle, l'utilisation de la MS dans un premier temps permet de savoir si les cystéines sont à l'état réduit ou oxydé. Afin de savoir précisément quelles cystéines sont oxydées dans un pont disulfure, les spectres HSQC ^{13}C permettent de déterminer les déplacements chimiques des C_β des cystéines. Si ceux-ci sont engagés dans un pont disulfure leur déplacement chimique est centré autour de 42 ppm alors que les C_β des cystéines libres possèdent un déplacement chimique de l'ordre de 27 ppm²⁶⁵. Enfin, la visualisation de taches de corrélation NOE entre les H_β de deux cystéines liées fournit un dernier argument en faveur de la présence du pont disulfure.

Toutes ces méthodes ont été utilisées pour déterminer les deux ponts disulfure de la svicéucine. L'analyse des spectres HSQC ^{13}C à 298 K dans le d_3 -MeOH a permis de relever les valeurs des déplacements chimiques des C_β de trois cystéines sur quatre du peptide. La tache de corrélation entre les H_β de deux cystéines a été visualisée sur les spectres NOESY dans H_2O pH = 4,7 à 950 MHz.

IV.5.4. Protocole de modélisation moléculaire

IV.5.4.1. Principe de la modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire consiste à rechercher les conformations stables de la molécule étudiée sous les contraintes de distance et de géométrie précédemment déterminées. Il s'agit donc de trouver l'état de plus basse énergie du peptide. Celle-ci dépend des conditions dans laquelle se trouve la molécule et peut être simulée par un champ de force fonction des interactions entre les différents atomes. A l'équilibre et en l'absence de mouvement, l'énergie moléculaire (E_{totale}) est la somme de l'énergie potentielle (E_{pot}) des contraintes internes de la molécule et de l'énergie des contraintes expérimentales (E_{cont}). Soit

$$E_{\text{totale}} = E_{\text{pot}} + E_{\text{cont}}$$

$$\text{avec } E_{\text{pot}} = E_{\text{liaisons}} + E_{\text{angles}} + E_{\text{dièdres}} + E_{\text{impropres}} + E_{\text{VdW}} + E_{\text{électrostatique}} + E_{\text{liaisonsH}}$$

$$\text{et } E_{\text{cont}} = E_{\text{NOE}} + E_{\text{cdih}}$$

où E_{liaisons} correspond à l'énergie des liaisons atomiques, E_{angles} à l'énergie de déformation des angles de valence, $E_{\text{dièdres}}$ à l'énergie de torsion des liaisons, $E_{\text{impropres}}$

à l'énergie de variations des angles impropres, E_{VdW} à l'énergie des interactions de Van der Waals, $E_{\text{électrostatique}}$ à l'énergie des interactions de type coulombien entre atomes chargés, E_{NOE} à l'énergie des contraintes de distance et E_{cdih} à l'énergie des contraintes d'angles dièdres (Tableau 11).

Tableau 11 : Expression des termes énergétiques utilisés dans les calculs de modélisation moléculaire. Avec k_r , k_θ , k_ϕ , k_ω , K_{NOE} et K_{cdih} les constantes de force ; r et d les distances entre deux atomes ; θ , ϕ et ω les angles de valence, dièdres et impropres ; A_{ij} , B_{ij} deux paramètres dépendant des atomes i et j ; A' et B' deux constantes qui dépendent de la nature des atomes accepteur (A) et donneur (D) ; AA désigne l'antécédent de l'atome accepteur.

Energie potentielle :

Liaisons :	$E_{\text{liaisons}} = \sum k_r (r - r_0)^2$
Angles de valence :	$E_{\text{angles}} = \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2$
Torsion :	$E_{\text{dièdres}} = \sum k_\phi (1 + \cos(n\phi))^2$ avec $n \in \{1;2;3;4;5;6\}$
Angles impropres :	$E_{\text{impropres}} = \sum k_\omega (\omega - \omega_0)^2$
Interactions électrostatiques :	$E_{\text{électrostatique}} = \sum_{i,j} \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{q_i q_j}{r_{ij}}$
Interactions de VdW :	$E_{VdW} = \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right)$
Liaisons hydrogène :	$E_{\text{liaisonsH}} = \sum \left(\frac{A'}{r_{AD}^{12}} - \frac{B'}{r_{AD}^{10}} \right) \cos^m \theta_{A-H-D} \cos^n \theta_{AA-A-H}$ avec $m \in \{0,2,4\}$ et $n \in \{0,2\}$

Energie des contraintes :

Contraintes de distance :	$E_{NOE} = K_{NOE} (d - d_0)^2$
Contraintes angulaires :	$E_{cdih} = K_{cdih} (\phi - \phi_0)^2$

IV.5.4.2. Protocole (X-PLOR) utilisé dans la modélisation

La dynamique moléculaire par recuit simulé permet d'explorer *in silico* l'espace conformationnel de la molécule et de trouver les puits de potentiel énergétique et la structure tridimensionnelle associée.

Le protocole de modélisation est décrit dans l'organigramme suivant (Figure 46). Il comporte deux étapes de recuit simulé compte-tenu de la présence des liaisons disulfure du peptide.

Afin de ne pas « forcer » la modélisation en imposant dès la structure initiale les liaisons entre les cystéines, celle-ci a été générée uniquement avec la liaison lactame entre la chaîne latérale de Asp9 et la partie N-terminale Cys1. De cette manière, seules les contraintes RMN de distance et angulaires imposeront, lors du premier recuit simulé, le sens d'insertion de la partie C-terminale à travers le cycle ainsi que le rapprochement spatial des cystéines du peptide.

La deuxième étape de recuit simulé a été réalisée une fois que les ponts disulfure du peptide ont été établis. De cette manière, on vérifie la conformité des structures générées en présence de nouvelles contraintes imposées par les ponts disulfure.

IV.5.4.3. Génération des structures

Pour la génération du premier jeu de structures, nous avons utilisé un champ de force simplifié²⁶⁶ dans lequel les angles dièdres, les interactions électrostatiques et les liaisons hydrogène ne sont pas pris en compte. L'écriture de l'énergie de la molécule devient

$$E_{totale} = E_{liaisons} + E_{angles} + E_{impropres} + E_{VdW} + E_{NOE} + E_{cdih}$$

L'utilisation de X-PLOR nécessite la présence de deux fichiers de paramètres décrivant les éléments de la molécule à modéliser. Le fichier de topologie (topallhdg.pro) décrit les atomes, les liaisons et les angles des acides aminés de la molécule à modéliser. Les caractéristiques physiques (charge électrique, masse, électronégativité) des atomes sont aussi décrites. X-PLOR génère ainsi à partir de ce fichier et d'un autre fichier comportant la séquence en résidu un fichier .psf de description de la molécule, dans lequel les atomes et les angles du peptide sont détaillés dans l'ordre de la séquence.

Le fichier parallhdg.pro comporte les valeurs d'équilibre des angles de valence, dièdres, impropres et des liaisons formés par les atomes ainsi que les valeurs numériques énergétiques nécessaires au calcul de recuit simulé. A partir du fichier de séquence .psf et de ce fichier de paramètres, X-PLOR va établir un fichier de coordonnées .pdb, lisible par des logiciels de visualisation de structures chimiques, qui servira de structure initiale à la modélisation. Dans le cas de la svicéucine, il nous a fallu préciser une liaison lactame entre Cys1 et Asp9.

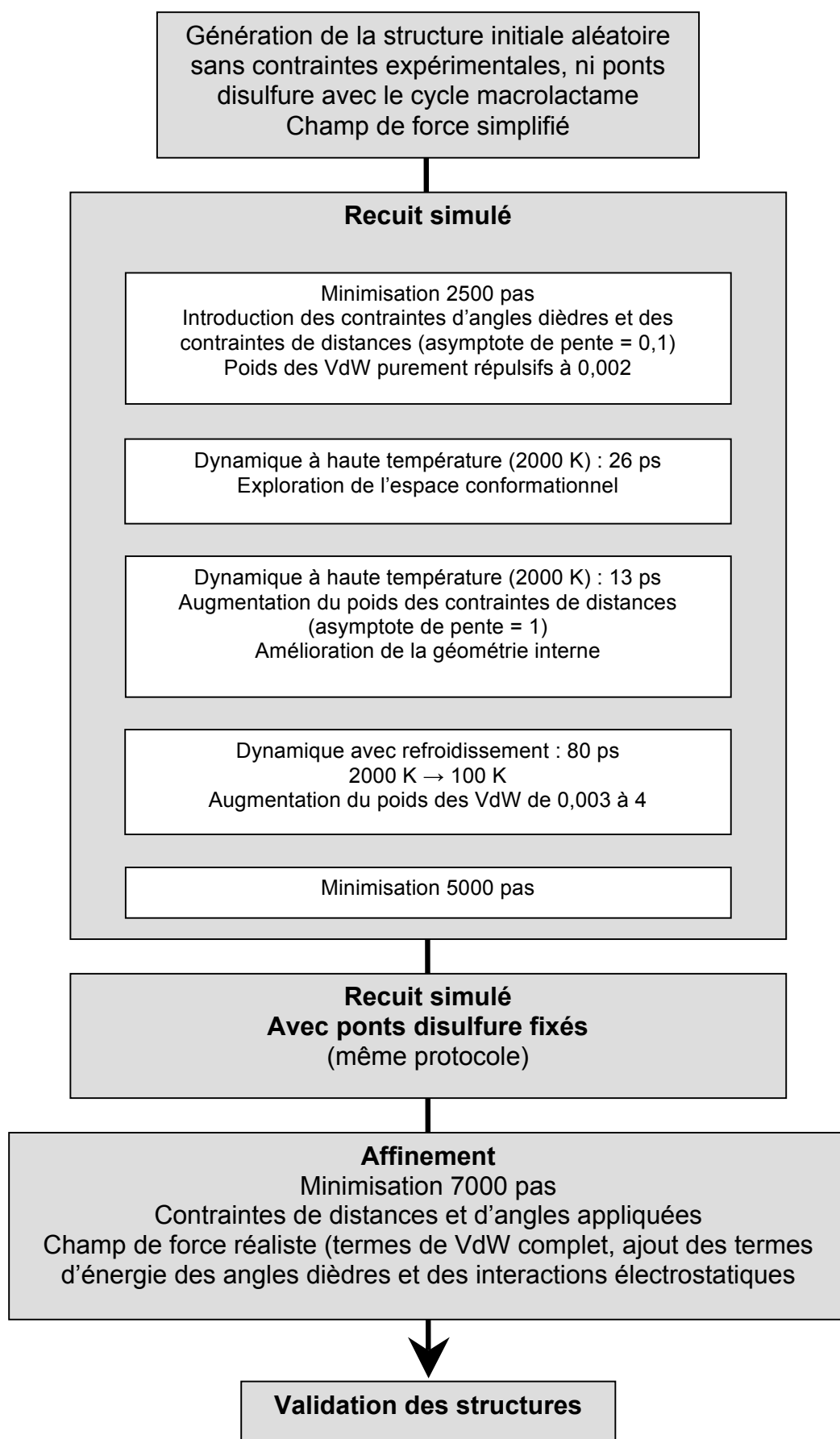


Figure 46 : Protocole général utilisé dans la modélisation moléculaire sous contraintes RMN de la svicéucine.

Cette structure initiale a été soumise à un premier protocole de recuit simulé dans lequel ont été introduits les termes énergétiques des contraintes RMN (E_{NOE} et E_{cdih}). Le recuit simulé s'est déroulé en quatre étapes en imposant $K_{NOE} = 50$ kcal.mol⁻¹.Å⁻² et $K_{cdih} = 20$ kcal.mol⁻¹.rad⁻² :

- **Minimisation** : cette étape, destinée à éliminer les contacts stériques, consiste en un algorithme de Powell de 2500 pas. On prend en compte le potentiel répulsif des termes énergétiques des interactions de Van der Waals (E_{vdw}) avec un poids de 0,002 alors qu'il est de 1 pour les autres termes ($E_{liaisons}$, E_{angles} , $E_{impropres}$ et E_{cdih}).
- **Dynamique (2000 K)** : au cours de cette étape à haute température, les vitesses des atomes sont augmentées progressivement en portant la température à 2000 K. On utilise pour cela un algorithme de Verlet de 26 ps avec un pas de 0,002 ps. Le terme d'énergie des angles de valence possède un poids de 0,4, celui des angles impropres 0,1 et celui des interactions répulsives de Van der Waals 0,002. Afin de permettre un repliement de la molécule, les poids de chaque terme énergétique ont été augmentés jusqu'à 1 (sauf pour E_{vdw} qui reste à 0,002) pendant 13 ps avec un pas de 0,002 ps.
- **Refroidissement** : les interactions non-liantes ont été totalement prises en compte et le système a été refroidi de 2000 K à 100 K par pas de 20 K, au cours d'une dynamique moléculaire de Verlet pendant 80 ps avec un pas de 0,002 ps. Le poids des interactions répulsives de Van der Waals a été augmenté de 0,003 à 4, celui des autres termes énergétiques est maintenu à 1.
- **Affinement** : l'énergie de la structure est enfin minimisée par un algorithme de Powell de 5000 pas.

Les ponts disulfure putatifs des structures obtenues à l'issue de ce premier recuit simulé ont été ensuite imposés et le jeu de structure a été soumis à un deuxième recuit simulé de mêmes paramètres que le précédent afin de vérifier que l'introduction de cette nouvelle contrainte ne donnait pas de structures possédant des énergies aberrantes.

IV.5.4.4. Optimisation des structures

Le jeu de structure obtenu à l'issue des deux recuits simulés est ensuite optimisé par une étape d'affinement. Un champ de force CHARMM22 plus réaliste tenant compte des termes énergétiques des angles dièdres et des interactions électrostatiques ($\epsilon = 32,7$) a été utilisé au cours d'une minimisation par un algorithme de Powell de 7000 pas.

IV.5.4.5. Validation des structures

Enfin, les 100 structures générées et optimisées ont été visualisées à l'aide des logiciels PyMOL (DeLano Scientific LLC) et MOLMOL²⁶⁷. Ce dernier programme a notamment été utilisé dans l'étude des RMSD (« root-mean-square deviation ») et des diagrammes de Ramachandran de chaque structure. Le logiciel PROCHECK-NMR^{268,269} a servi pour l'analyse statistique des structures. Les RMSD ont été calculés à partir du logiciel X-PLOR. Les 20 structures qui possédaient l'énergie la plus basse, qui ne comportaient aucune violation de contraintes (différence de distance $< 0,2$ Å et différence d'angle $< 5^\circ$) et qui respectaient les zones autorisées du diagramme de Ramachandran ont été sélectionnées puis déposées sur les banques de données de structures protéiques (PDB et BMRB).

V. Etude de la dynamique de protéine par relaxation de spin ^{15}N

Cette étude a été effectuée en collaboration avec Ewen Lescop et Eric Guittet du Laboratoire de Chimie et de Biologie Structurales de l'Institut de Chimie des Substances Naturelle de Gif-sur-Yvette.

V.1. Principe et intérêt de l'étude dynamique des protéines

La structure seule des protéines n'est pas une donnée suffisante pour comprendre l'activité biologique de ces molécules. L'amélioration des techniques de détermination structurale des protéines a fait de grandes avancées dans la dernière

décennie, et la compréhension de la dynamique interne des molécules biologiques suscite de plus en plus d'intérêt^{270–272}.

La fonction des protéines est aussi la résultante de leur dynamique à différentes échelles de temps. La RMN est la seule technique permettant de donner des renseignements structuraux à l'échelle atomique tout en explorant l'ensemble de la gamme de temps : de la femtoseconde à la seconde, voire jusqu'aux jours ou aux années. Les mouvements rapides (fs-ps) sont les vibrations et les mouvements de balancier des liaisons, le transfert de protons et la formation ou la rupture des liaisons hydrogène. La rotation des chaînes latérales, plus libres et la diffusion rotationnelle brownienne macromoléculaire explorent la gamme de la nanoseconde. Enfin, les processus de repliement, de formation de complexes, d'interaction protéine-protéine, de régulation allostérique ou de catalyse sont réalisés dans l'ordre de la microseconde et plus lentement encore.

Selon les expériences de RMN envisagées, on peut explorer chacune de ces gammes et envisager de visualiser chacun de ces processus dynamiques. On peut ainsi utiliser les couplages dipolaires résiduels (« residual dipolar coupling », RDC), la dispersion de relaxation (expériences $R_{1\rho}$ et CPMG), l'échange de proton amide, l'analyse de la forme du signal, l'échange ZZ, les déplacements chimiques et les expériences de relaxation de spin (R_1 , R_2 , R_{ex} et NOE) (voir Figure 47).

L'étude de la dynamique des protéines nécessite une sonde intramoléculaire dont le rôle est souvent (mais pas uniquement) joué par le vecteur formé par les liaisons N-H des groupes amides. Ces liaisons, présentes dans tous les résidus sauf les prolines, sont donc de bons marqueurs dynamiques internes et des expériences suffisamment sensibles associées à des modèles « simples » de description de la relaxation du noyau ^{15}N en lien avec la réorientation de vecteur **NH**, ont fait de ce noyau une cible de choix pour l'étude des mouvements au sein des protéines. Les expériences citées précédemment permettent d'en caractériser l'échelle de temps et l'amplitude.

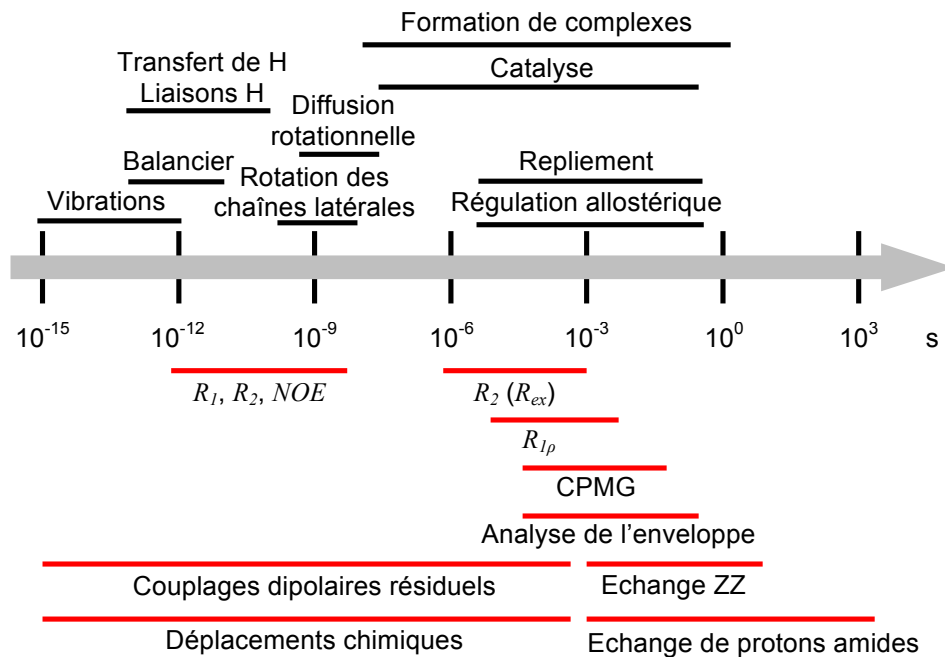


Figure 47 : Echelle de temps de la dynamique des protéines. Les processus dynamiques qui affectent les protéines sont représentés en noir, et les expériences de RMN permettant de les mesurer en rouge.

V.2. Les expériences de mesure de relaxation de spin ^{15}N

Les expériences les plus couramment utilisées dans l'étude de la dynamique des protéines sont : la relaxation de la composante longitudinale du spin (R_1), la relaxation transverse (R_2) et le *NOE* hétéronucléaire à l'état stationnaire. Les termes de relaxation sont définis comme l'inverse des constantes de temps pour chaque composant. Ainsi :

$$R_1 = 1/T_1 \text{ et } R_2 = 1/T_2$$

V.2.1. La relaxation longitudinale R_1

La relaxation longitudinale, ou relaxation spin-réseau, correspond à la mesure le long de l'axe du champ magnétique $\mathbf{B}_0$, de l'inverse de la constante de temps (T_1) lorsque l'aimantation retourne à l'état d'équilibre thermique. Cet état d'équilibre est défini selon la distribution de Boltzmann et le phénomène de relaxation est causé par l'interaction du spin (et l'échange d'énergie) avec son environnement, d'où le nom de relaxation spin-réseau.

La mesure de R_1 (Figure 48) peut se faire soit lors d'expériences 1D ou 2D. Elle consiste à effectuer une impulsion à 180° selon l'axe z , puis à laisser le système relaxer pendant un délai imposé arbitrairement et à réaliser une impulsion de 90° selon l'axe z pour basculer le signal dans le plan xy . Dans chacun de ces cas, l'expression de l'intensité du signal est légèrement différente. Pour une expérience 1D, l'intensité du signal en fonction du temps A_t s'exprime comme :

$$A_t = A_0(1 - 2e^{-R_1 t})$$

avec A_t , l'intensité du signal à l'instant t et A_0 , l'intensité du signal au temps 0. A deux dimensions, cette intensité devient :

$$A_t = A_0 e^{-R_1 t}$$

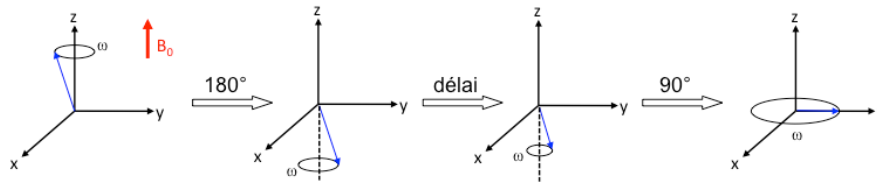


Figure 48 : Enregistrement du signal de relaxation R_1 (« inversion-recovery »).

V.2.2. La relaxation transverse R_2

La relaxation transverse, ou relaxation spin-spin, est le phénomène de mesure de la diminution d'intensité du signal dans le plan perpendiculaire au champ magnétique $\mathbf{B}_0$, *i.e.* plan xy . Cette relaxation est provoquée par l'échange entre les spins qui précessent autour de $\mathbf{B}_0$, que l'on nomme R_{ex} . La relaxation transverse pure R_2^0 est cependant un phénomène plus complexe, qui fait intervenir l'évolution de chaque spin indépendamment les uns des autres. L'application d'une impulsion magnétique impose une orientation identique pour tous les spins du système, typiquement en mettant l'aimantation globale suivant l'axe x . Puis, à l'arrêt de cette impulsion, chaque spin évolue indépendamment, en fonction du champ magnétique local vu par le spin, et le système perd cette cohérence. Un autre terme de relaxation peut aussi exister du fait de l'échange d'un spin entre plusieurs états caractérisés par des déplacements chimiques différents. Dans ce cas, l'oscillation entre les différentes formes peut mener, si la vitesse d'interconversion approche la différence de déplacement chimique, à une contribution R_{ex} à la relaxation transverse.

Le terme R_2 s'exprime donc :

$$R_2 = R_2^0 + R_{ex}$$

Le phénomène d'échange entre les spins parcourt des temps de l'ordre de la μs à la ms.

La mesure de R_2 (Figure 49) fait intervenir une impulsion à 90° selon l'axe z qui fait basculer le signal dans le plan xy suivie d'un délai imposé puis d'une deuxième impulsion à 180° selon l'axe z suivie elle aussi d'un délai.

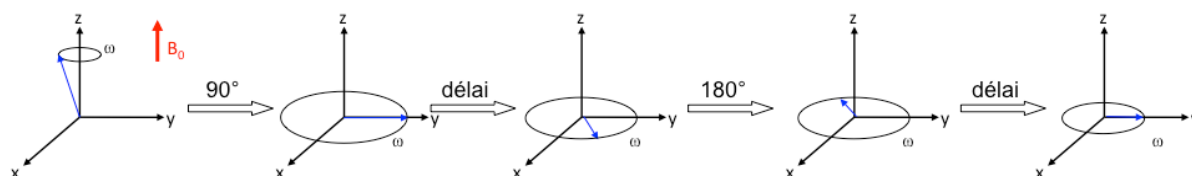


Figure 49 : Enregistrement du signal de relaxation R_2 (« spin-echo »).

V.2.3. L'effet Overhauser nucléaire hétéronucléaire à l'état stationnaire

Le *NOE* hétéronucléaire à l'état stationnaire, noté $\{^1H\}^{15}N$ -hetNOE, correspond à la relaxation croisée entre deux spins couplés de manière dipolaire. Il dépend entre autre, comme tout *NOE*, de la distance entre les deux spins, des rapports gyromagnétiques des noyaux considérés et de la dynamique de la liaison N-H.

Afin de mesurer cet effet, on effectue une présaturation des spins 1H , ce qui a pour effet d'égaliser les populations des transitions de spin 1H . Ceci provoque une évolution de l'aimantation des spins ^{15}N jusqu'à un état stationnaire. Le *NOE* est alors mesuré comme le rapport des intensités du signal ^{15}N avec présaturation (A_{sat}) et sans présaturation (A_{eq}) des spins protons :

$$NOE = \frac{A_{sat}}{A_{eq}}$$

La différence de *NOE* entre deux spins 1H correspond à une différence de dynamique de la liaison N-H, si on estime que la distance entre les deux noyaux est fixe.

V.3. Relation entre les paramètres de relaxation ^{15}N et la dynamique d'une protéine

V.3.1. Relation entre les fonctions de densité spectrale et les paramètres de relaxation ^{15}N

On introduit la fonction de densité spectrale $J(\omega)$. Elle exprime la distribution des fréquences du champ magnétique, ce qui se conçoit physiquement en termes de distribution des mouvements de la protéine. Mathématiquement, c'est la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation $G(\tau)$ qui décrit la perte de cohérence de la protéine avec elle-même au cours du temps.

On peut calculer les fonctions de densité spectrale aux cinq fréquences qui nous intéressent, $J(0)$, $J(\omega_N)$, $J(\omega_H)$, $J(\omega_H + \omega_N)$ et $J(\omega_H - \omega_N)$. Cependant, les trois fonctions de densité spectrale à haute fréquence ($J(\omega_H)$, $J(\omega_H + \omega_N)$ et $J(\omega_H - \omega_N)$) sont très similaires comparées à celles aux basses fréquences ($J(0)$ et $J(\omega_N)$), on les rassemble donc en une seule fonction de densité spectrale réduite $J(\omega_h)$.

Cette fonction $J(\omega)$ est reliée aux paramètres de relaxation par les relations mathématiques exprimées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Relations entre les paramètres de relaxation et les fonctions de densité spectrale réduite²⁷⁰.

Relations entre les paramètres de relaxation et les fonctions de densité spectrale
$R_1 = \frac{1}{4} d^2 [3J(\omega_N) + 7J(\omega_h)] + c^2 J(\omega_N)$ $R_2 = \frac{1}{8} d^2 [4J(0) + 3J(\omega_N) + 13J(\omega_h)] + \frac{1}{6} c^2 [4J(0) + 3J(\omega_N)]$ $NOE = 1 + \frac{1}{4} T_1 d^2 (\gamma_H / \gamma_N) [5J(\omega_h)]$
Expression des fonctions de densité spectrale en fonction des paramètres de relaxation
$J(0) = \frac{1}{3d^2 + 4c^2} \left(6R_2 - R_1 \left(3 + \frac{18}{5} (\gamma_N / \gamma_H) (NOE - 1) \right) \right)$ $J(\omega_N) = \frac{4}{3d^2 + 4c^2} \left(R_1 \left(1 - \frac{7}{5} (\gamma_N / \gamma_H) (NOE - 1) \right) \right)$ $J(\omega_h) = \frac{4}{5d^2} (R_1 (\gamma_N / \gamma_H) (NOE - 1))$

Le calcul des fonctions de densité spectrale réduites grâce aux paramètres R_1 , R_2 et NOE permettent ensuite de les modéliser par une des équations « model-free ». Le modèle se rapprochant le plus des données expérimentales est donc susceptible de décrire le mieux les mouvements de la protéine.

V.3.2. Description dynamique d'une protéine

Le formalisme par différents modèles physiques appelés « model-free », introduit par Lipari et Szabo^{273,274}, permet l'exploitation des données de relaxation ^{15}N enregistrées. L'utilisation de tels modèles nous donne, entre autres, deux paramètres qui représentent de manière plus concrète que les valeurs de relaxation, la physique des mouvements de la protéine. On évalue ainsi le paramètre d'ordre S^2 et le temps de corrélation τ_c .

Le paramètre d'ordre S^2 représente la rigidité interne du système pour chaque vecteur **NH** à chaque endroit de la molécule. Compris entre 0 et 1, plus il est proche de 1, plus le résidu ou l'atome est considéré comme ordonné ou rigide dans le repère global de la protéine. On définit plusieurs temps de corrélation τ_c selon le modèle envisagé. On trouve ainsi le temps de corrélation global de la molécule (τ_m) et le temps de corrélation effectif du vecteur **NH** (τ_e). Ces temps de corrélation représentent le temps moyen que met le vecteur **NH** étudié pour parcourir un angle de 1 rad. Plus il est court, plus la protéine est soumise à une dynamique interne qui la fait changer d'état rapidement. On relie les deux paramètres S^2 et τ_c à la dynamique des vecteurs internes par la fonction de densité spectrale $J(\omega)$.

V.3.3. Approche « model-free » de modélisation de la dynamique d'une protéine

Le principe de l'approche « model-free » consiste (i) à déterminer le tenseur de diffusion pour la molécule, c'est-à-dire la description mathématique du comportement de la diffusion de la molécule dans son milieu ; (ii) à partir du tenseur de diffusion, de modéliser les paramètres de relaxation de chaque résidu par un modèle « model-free », ce qui permet d'en tirer des paramètres dynamiques pour chaque résidu et de décrire ainsi la mobilité interne de la protéine ; (iii) d'évaluer la cohérence du modèle calculé. On choisit ensuite le tenseur de diffusion et les modèles associés présentant la meilleure robustesse statistique.

V.3.3.1. Tenseur de diffusion

Le tenseur de diffusion représente le comportement diffusif de la protéine dans son milieu. Celle-ci peut présenter un comportement de rotation globale isotrope, auquel cas, aucune des directions de l'espace n'est privilégiée par la molécule pour diffuser. Le tenseur de diffusion se résume donc à un unique paramètre, le temps de corrélation globale de la protéine τ_m . Il est déterminé à partir du rapport R_2/R_1 des résidus supposés les moins flexibles dans la structure du peptide, *a priori* ceux engagés dans une structure secondaire.

Si la description dynamique de la molécule par une rotation globale isotrope n'est pas satisfaisante, il faut donc distinguer la diffusion selon chacune des trois directions de l'espace. On obtient alors un tenseur de diffusion anisotrope avec un temps de corrélation pour chacun des axes de la molécule.

V.3.3.2. « Model-free » des résidus

Différents modèles « model-free » peuvent être utilisés pour décrire la dynamique de la protéine. Ils sont répertoriés ainsi que les paramètres qu'ils prennent en compte dans le Tableau 13. La fonction de densité spectrale s'exprime différemment selon le modèle utilisé. Par exemple, dans le cas d'une molécule rigide animée uniquement par le mouvement brownien (*m0*), elle s'écrit comme :

$$J(\omega) = \frac{\tau_m}{1 + (\omega\tau_m)^2}$$

Dans un autre exemple, le modèle Lipari-Szabo simplifié (*m1*), modèle le plus simple qui tient compte des mouvements internes de la protéine et considère qu'ils sont beaucoup plus rapides que la réorientation globale de la protéine, elle devient :

$$J(\omega) = \frac{S^2\tau_m}{1 + (\omega\tau_m)^2}$$

Les autres modèles couramment utilisés sont :

- Lipari-Szabo classique (*m2*) : les mouvements internes ne sont plus assez rapides pour être négligés, d'où l'apparition du temps de corrélation des mouvements internes τ_e ;
- Lipari-Szabo simplifié avec un terme d'échange conformationnel (*m3*) :

on introduit le terme R_{ex} ;

- Lipari-Szabo classique avec un terme d'échange conformationnel ($m4$) :
on utilise un temps de corrélation des mouvements interne τ_e ainsi qu'un terme d'échange R_{ex} ;
- Lipari-Szabo étendu²⁷⁵ ($m5$) : les mouvements internes ne sont plus décrits par un seul paramètre d'ordre et un seul temps de corrélation mais sont discriminés en deux types de mouvements lents (S_s^2, τ_s) et rapides (S_f^2, τ_f) décorrélés l'un de l'autre. Si on néglige la contribution du temps de corrélation des mouvements rapides, on n'a plus que trois paramètres et $S^2 = S_s^2 S_f^2$. Le modèle de Lipari-Szabo se retrouvent avec $\tau_e = \tau_s$.

Les modèles utilisés ainsi que leurs paramètres, leurs fonctions de densité spectrale respective et les hypothèses formulées dans chaque cas sont résumés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Différents modèles et leurs paramètres associés pour modéliser la dynamique interne des molécules²⁷⁰.

Modèle	Paramètres	Fonction densité spectrale	Hypothèses
$m0$: rotation globale isotrope	-	$J(\omega) = \frac{\tau_m}{1 + (\omega\tau_m)^2}$	
$m1$: Lipari-Szabo simplifié	$\{S^2\}$	$J(\omega) = \frac{S^2\tau_m}{1 + (\omega\tau_m)^2}$	$R_{ex} \approx 0$ $\tau_e \ll \tau_m$
$m2$: Lipari-Szabo classique	$\{S^2, \tau_e\}$	$J(\omega) = \frac{S^2\tau_m}{1 + (\omega\tau_m)^2} + \frac{(1-S^2)\tau_e'}{1 + (\omega\tau_e')^2}$	$R_{ex} \approx 0$
$m3$: Lipari-Szabo simplifié avec échange	$\{S^2, R_{ex}\}$	$J(\omega) = \frac{S^2\tau_m}{1 + (\omega\tau_m)^2}$	$\tau_e \ll \tau_m$
$m4$: Lipari-Szabo classique avec échange	$\{S^2, \tau_e, R_{ex}\}$	$J(\omega) = \frac{S^2\tau_m}{1 + (\omega\tau_m)^2} + \frac{(1-S^2)\tau_e'}{1 + (\omega\tau_e')^2}$	
$m5$: Lipari-Szabo étendu	$\{S^2, S_f^2, \tau_s\}$	$J(\omega) = \frac{S^2\tau_m}{1 + (\omega\tau_m)^2} + \frac{(1-S^2)\tau_s'}{1 + (\omega\tau_s')^2}$	$R_{ex} \approx 0$ $\tau_f \ll \tau_m$

Avec les relations suivantes :

$$\frac{1}{\tau_e'} = \frac{1}{\tau_c} + \frac{1}{\tau_e} \text{ (modèles } m2 \text{ et } m4) \text{ et } \frac{1}{\tau_s'} = \frac{1}{\tau_c} + \frac{1}{\tau_s} \text{ (modèle } m5)$$

V.3.3.3. Cohérence du modèle calculé

Les modèles dégagés par le calcul sont ensuite soumis à un test statistique qui permet d'évaluer leur robustesse. Le paramètre χ^2 est utilisé pour cela, il s'exprime sous la forme :

$$\chi^2 = \sum_i \left[\frac{(R_i - R_i')^2}{\sigma_i^2} \right]$$

avec R la donnée de relaxation expérimentale, R' la donnée calculée selon le modèle, et σ l'erreur expérimentale. Plus ce paramètre est faible, plus le modèle décrit correctement les données expérimentales.

On calcule ce paramètre en commençant par modéliser les données par le modèle le plus simple ($m1$) jusqu'au plus compliqué ($m5$) pour chaque résidu. Un χ^2 théorique est calculé à partir de données aléatoires, si 5 % ou moins des χ_{th}^2 est supérieur aux χ_{ex}^2 alors on considère que le modèle est accepté.

En pratique, le paramètre χ_{tot}^2/df , où df définit les degrés de liberté de la molécule, exprime l'évaluation de la modélisation à l'échelle de la molécule. Il consiste en la somme des χ^2 pour tous les résidus, divisé par les degrés de liberté de la molécule. Plus il est bas, plus le comportement dynamique de la protéine est bien décrit par les modèles choisis.

V.4. Instrumentation

Les expériences d'étude dynamique de MccJ25 par relaxation de spin ^{15}N ont été menées sur un spectromètre Bruker AVANCE III 950 MHz équipé d'une crysonde avec gradient Z à triple résonance ^1H - ^{13}C - ^{15}N TCI, sur un spectromètre Bruker AVANCE II 600 MHz équipé d'une crysonde avec gradient Z à triple résonance ^1H - ^{13}C - ^{15}N TXI et sur un spectromètre Bruker AVANCE

liquide/solide 700 MHz équipé d'une crysonde avec gradient Z à triple résonance ^1H - ^{13}C - ^{15}N PATXI.

V.5. Obtention et préparation des échantillons

MccJ25 a été produite par une culture d'*E. coli* MC4100 pTUC202 dans un milieu enrichi en ^{15}N selon le protocole décrit en II.1.1 et purifiée selon la méthode décrite en II.1.2. L'échantillon purifié a été lyophilisé et conservé au congélateur à $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

500 μg de l'échantillon ont été dissous dans MeOH ou H_2O afin d'enregistrer les spectres RMN souhaités à différentes températures.

V.6. Séquences et acquisition des spectres

Les mesures des temps de relaxation T_1 et T_2 sont effectuées à partir des séquences d'impulsions suivantes²⁷² (Figure 50, Figure 51 et Figure 52).

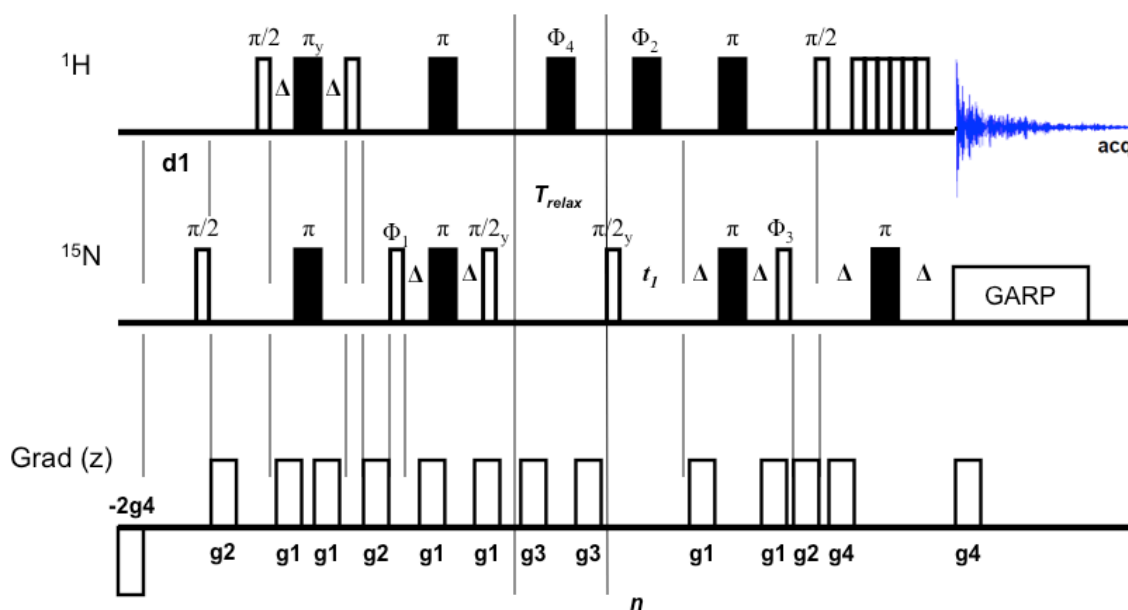


Figure 50 : Séquence d'impulsions pour l'enregistrement de R_1 .

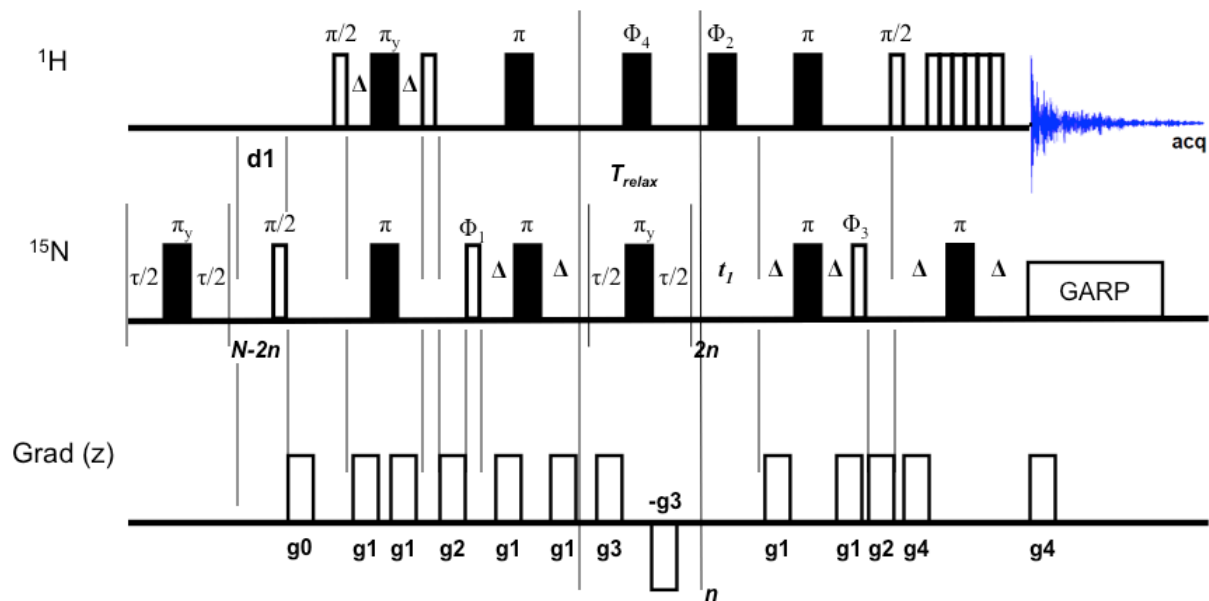


Figure 51 : Séquence d'impulsions pour l'enregistrement de R_2 .

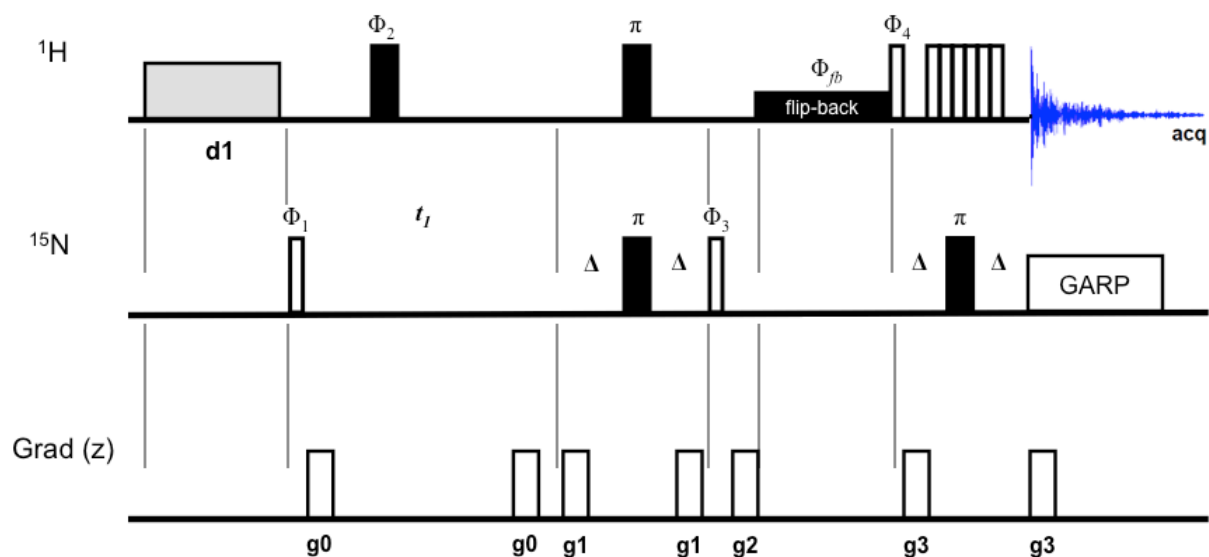


Figure 52 : Séquence d'impulsions pour l'enregistrement de $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -hetNOE.

Le tableau suivant (Tableau 14) récapitule les séquences utilisées et les paramètres d'acquisition pour chacune d'entre elles.

Tableau 14 : Expériences réalisées dans le cadre de la relaxation de spin ^{15}N de MccJ25. Les délais τ_d sont présentés dans l'ordre dans lequel ils ont été enregistrés.

Solvant	Champ (MHz)	T (K)	Expériences
$d_3\text{-MeOH}$	700.13	288	R_1 (τ_d = 0, 100, 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 1000, 100) R_2 (τ_d = 0, 32, 64, 128, 256, 512, 32, 64, 700, 24, 96, 104, 132, 0 ms)
		298	R_1 (τ_d = 0, 100, 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 1000, 100 ms) R_2 (τ_d = 64, 128, 256, 512, 32, 700, 24, 96, 104, 132, 0 ms) NOE
		308	R_1 (τ_d = 0, 100, 300, 500, 700, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 1000, 100 ms) R_2 (τ_d = 0, 32, 64, 128, 256, 512, 32, 64, 700, 24, 96, 104, 132, 0 ms) NOE
H_2O	600,33	288	R_1 (τ_d = 20, 900, 1200, 600, 1000, 750, 20, 1400, 100, 1600, 400 ms) R_2 (τ_d = 1, 50, 2, 3, 40, 4, 5, 35, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 30 ms) NOE
		298	R_1 (τ_d = 20, 900, 1200, 600, 1000, 750, 20, 1400, 100, 1600, 400 ms) R_2 (τ_d = 1, 50, 2, 3, 40, 4, 5, 35, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 30 ms) NOE
		308	R_1 (τ_d = 20, 900, 1200, 600, 1000, 750, 20, 1400, 100, 1600, 400 ms) R_2 (τ_d = 1, 50, 2, 3, 40, 4, 5, 35, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 30 ms) NOE
	950,13	288	R_1 (τ_d = 1, 500, 100, 1600, 900, 200, 1200, 800, 300, 700, 1100, 1500, 400, 1400, 100, 1300, 1000 ms) R_2 (τ_d = 0, 510, 24.48, 408, 48.96, 306, 32.64, 204, 24.48, 65.28, 102, 126.48, 265.2 ms) NOE
		298	R_1 (τ_d = 1, 500, 100, 1600, 900, 200, 1200, 800, 300, 700, 1100, 1500, 400, 1400, 100, 1300, 1000 ms) R_2 (τ_d = 1, 25, 2, 20, 4, 18, 6, 16, 8, 14, 10, 22 ms) NOE
		308	R_1 (τ_d = 1, 500, 100, 1600, 900, 200, 1200, 800, 300, 700, 1100, 1500, 400, 1400, 100, 1300, 1000 ms) R_2 (τ_d = 0, 460, 48, 400, 24, 300, 32, 200, 24, 64, 100, 124, 260 ms) NOE

V.7. Traitement des données

Les données de dynamique par relaxation de spin ^{15}N de MccJ25 ont été analysées avec le logiciel NMRViewJ²⁷⁶. Les paramètres extraits de cette première analyse (R_1 , R_2 , NOE) ont été ensuite analysés par le logiciel DYNAMICS^{277,278} afin

de déterminer le modèle de dynamique moléculaire applicable au peptide et d'en tirer les paramètres S^2 et τ_c .

Chapitre II : Éléments de séquence et de topologie nécessaires à la structure lasso, exemple de la microcine J25

La topologie de la structure lasso de la MccJ25 est principalement composée de deux parties : un cycle macrolactame dans la partie N-terminale à l'intérieur duquel est enchâssée la queue C-terminale, ce qui forme une boucle en épingle à cheveux β ¹⁴⁵. Pour déterminer les éléments de séquence de la structure lasso, nous avons étudié les différentes positions de la séquence de MccJ25 afin d'évaluer leur importance relative dans cette topologie. La mutagénèse dirigée sur le gène codant le précurseur du peptide lasso a permis de générer, grâce à la machinerie biosynthétique d'*E. coli*, des variants stratégiquement conçus.

L'association de la MS/MS avec la digestion par la carboxypeptidase Y, enzyme qui hydrolyse les peptides par leur partie C-terminale, a permis d'évaluer rapidement la structure de chaque variant. Cette méthode, validée par l'étude RMN de certains peptides, a été corrélée à l'étude de l'activité antimicrobienne de chaque peptide contre la souche *S. enterica* sp. *enterica* sérotype Enteritidis.

Cette étude a été publiée dans la revue **ChemBioChem** sous la référence :

Ducasse R*, Yan KP*, Goulard C, Blond A, Li Y, Lescop E, Guittet E, Rebuffat S & Zirah S (2012) Sequence Determinants Governing the Topology and Biological Activity of a Lasso Peptide, Microcin J25. *ChemBioChem* **13**: 371-380

**Ces auteurs ont contribué de manière équivalente à cette étude.*

Sequence Determinants Governing the Topology and Biological Activity of a Lasso Peptide, Microcin J25

Rémi Ducasse,^[a] Kok-Phen Yan,^[a] Christophe Goulard,^[a] Alain Blond,^[a] Yanyan Li,^[a] Ewen Lescop,^[b] Eric Guittet,^[b] Sylvie Rebuffat,^[a] and Séverine Zirah^{*[a]}

Microcin J25 is a potent antibacterial peptide produced by *Escherichia coli* AY25. It displays a lasso structure, which consists of a knot involving an N-terminal macrolactam ring through which the C-terminal tail is threaded and sterically trapped. In this study, we rationally designed and performed site-specific mutations in order to pinpoint the sequence determinants of the lasso topology. Structures of the resulting variants were analysed by a combination of methods (mass spectrometry, NMR spectroscopy, enzymatic digestion), and correlated to the antibacterial activity. The selected mutations resulted in the pro-

duction of branched-cyclic or lasso variants. The C-terminal residues below the ring (Tyr20, Gly21) and the size of the macrolactam ring were revealed to be critical for both the lasso scaffold and bioactivity, while shortening the loop region (Tyr9–Ser18) or extending the C-terminal tail below the ring did not alter the lasso structure, but differentially affected the antibacterial activity. These results provide new insights for the bioengineering of antibacterial agents using a lasso peptide as template.

Introduction

Lasso peptides form a growing class of bioactive peptides that are ribosomally synthesized by bacteria and posttranslationally modified into a unique knotted scaffold. The lasso fold is composed of 16–21 residues and contains an N-terminal macrolactam ring formed by condensation of the amino group of a Gly or Cys residue at the N terminus with the side-chain carboxylate of an Asp or Glu at position 8 or 9. The C-terminal tail of the peptide is threaded and sterically trapped within this ring, forming a stable, rigid and compact knotted structure. Given its extraordinary resistance to denaturing conditions and many proteases, the lasso structure represents a valuable scaffold for the design of bioactive peptides.^[1] The proof-of-concept for application in drug design has been recently provided by Marahiel and co-workers, with the development of an integrin antagonist based on a lasso peptide scaffold.^[2]

Microcin J25 (MccJ25) is a 21-residue lasso peptide produced by *Escherichia coli* AY25.^[3] Structural analysis of MccJ25 revealed that the C-terminal tail (Tyr9–Gly21) loops back and is maintained in the 8-residue macrolactam ring (Gly1–Glu8) by the bulky side chains of Phe19 and Tyr20 that straddle the ring (Figure 1).^[4] The overall fold comprises two small antiparallel β -sheets. The first sheet, which encompasses the strands Val6–Pro7 and Phe19–Tyr20, is formed between a portion of the ring and the inserted C-terminal segment. The second sheet, located in the loop region (Tyr9–Ser18), is formed by residues Phe10–Val11 and Thr15–Pro16 connected by a β -turn motif. The steric entrapment of the tail within the ring generates a unique behaviour upon cleavage of the Tyr9–Ser18 loop. Indeed, cleavages of MccJ25 in solution (by proteolytic enzymes or acidic hydrolysis) or in the gas-phase (upon collision-induced or electron-capture dissociations) both yield two-pep-

tide complexes that are kept associated through the steric hindrance provided by Phe19 and Tyr20.^[4b,c,5]

MccJ25 exerts potent antibacterial activity against bacteria phylogenetically related to the producing strain, that is, *Enterobacteriaceae* such as certain *Escherichia*, *Salmonella* and *Shigella* species. Its antibacterial activity relies on 1) uptake by the target bacteria through interaction with the outer membrane iron-siderophore receptor FhuA,^[6] mediated by the energy transduction complex TonB–ExbB–ExbD, and interaction with the inner-membrane protein SbmA,^[7] and 2) inhibition of the bacterial RNA polymerase (RNAP) through obstruction of the enzyme secondary channel.^[8] Distinct regions of MccJ25 are involved in the uptake process and RNAP inhibition.^[9] The Val11–Pro16 loop is involved in MccJ25 interaction with FhuA,^[6] while the ring region, and in particular Tyr9^[10] and the C terminus,^[11] are required for the inhibition of RNAP. An alternative intracellular target of MccJ25 is the respiratory chain, through the production of reactive oxygen species.^[12]

[a] R. Ducasse,⁺ K.-P. Yan,⁺ C. Goulard, A. Blond, Dr. Y. Li, Prof. Dr. S. Rebuffat, Dr. S. Zirah
Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes
UMR 7245 CNRS–Muséum National d'Histoire Naturelle
CP 54, 57 rue Cuvier, 75005 Paris (France)
E-mail: szirah@mnhn.fr

[b] Dr. E. Lescop, Dr. E. Guittet
Centre de Recherche de Gif
Institut de Chimie des Substances Naturelles
UPR 2301 CNRS, Avenue de la Terrasse
91198 Gif-sur-Yvette (France)

[*] These authors contributed equally to this work.

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201100702>.

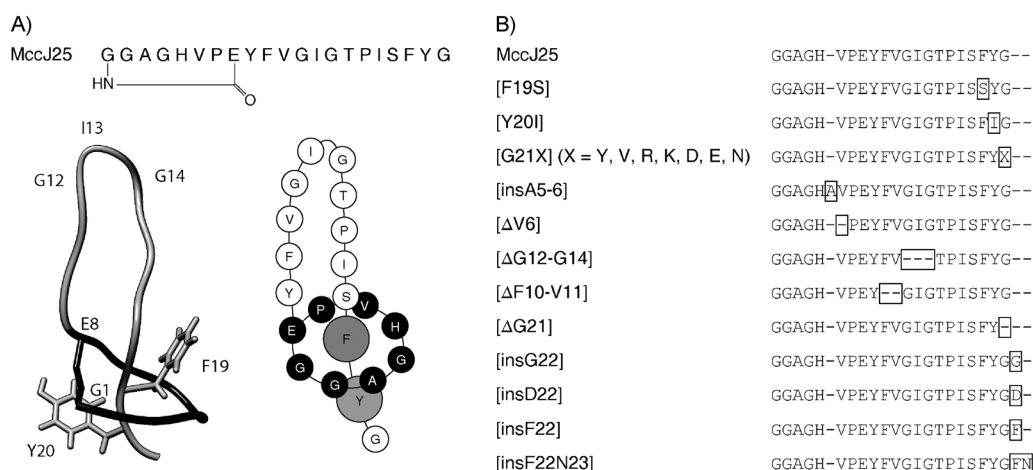


Figure 1. A) Sequence and three-dimensional structure of MccJ25, from Rosengren et al.^[4b] The macrolactam ring is coloured in black and the side chains of Phe19 and Tyr20 entrapping the C-terminal tail on each site of the ring are shown on the structure. B) Sequences of the variants generated in the present study. The substitutions, insertions (ins) and deletions (Δ) introduced in MccJ25 sequence are highlighted.

The MccJ25 biosynthesis gene cluster *mcjABCD* is encoded in a plasmid (pTUC202) and contains four genes. They encode a 58-residue precursor (McjA) composed of a 37-residue leader peptide followed by the 21 residues of MccJ25, two maturation enzymes involved in the post-translational modification of McjA (McjB and C) and an ATP-binding cassette (ABC) transporter involved in the export of mature MccJ25 and the immunity.^[13] We reconstituted in vitro the maturation of MccJ25 from its precursor McjA in the presence of McjB and McjC.^[14] Elucidation of MccJ25 biosynthesis has paved the way for genome-based discovery of new lasso peptides, as exemplified by capistrin, an antibacterial lasso peptide produced by *Burkholderia thailandensis* E264.^[15]

Site-directed mutagenesis on the gene encoding precursors have been reported for MccJ25^[10,16] and capistrin,^[17] revealing in both cases that the biosynthetic machinery is quite tolerant to amino acid substitutions. This property allows convenient engineering of lasso peptides. A systematic substitution of each amino acid in MccJ25 was carried out to delineate the amino acids critical for the production (including maturation and export), antibacterial activity and RNAP inhibition of the peptide.^[10] However, the topology (threaded or unthreaded structure) and stability of the generated variants were not investigated. Such structural information is crucial to understand the consequences of single point mutations. Indeed, amino acid substitution may affect peptide activity in two ways: firstly, through direct perturbation of protein–protein interactions while maintaining the lasso scaffold or secondly, through perturbation of the maturation process inducing the loss of lasso structure while keeping the amino acid position required for activity unchanged. In this study, we carried out a site-directed mutagenesis approach on *mcjA* coupled to a comprehensive structural characterization of the resulting variants. We focused the mutagenesis design on structural elements governing the steric entrapment of the tail within the macrolactam ring (substitutions of the bulky amino acids Phe19 and Tyr20 and of the C-terminal residue Gly21). In addition, we modified the lasso

topology through deletions or insertions that affect the sizes of the ring and the tail. The generated variants were analysed in terms of structure and antibacterial activity. The non-lasso topoisomer of MccJ25, that is, the branched-cyclic peptide MccJ25-lcm, was used in order to validate the methods developed to assess the lasso or non-lasso structure of the variants.

Results

Design and production of MccJ25 variants

In this study, we designed variants of MccJ25 to assess the tolerance of the lasso scaffold towards specific modifications of the amino acid sequence that should result in alterations of the steric entrapment of the C-terminal tail within the macrolactam ring, or modifications of the sizes of the ring and the tail (Figure 1 B). Thus, we performed substitutions of the two bulky amino acids in the tail (Phe19 and Tyr20) that are located on each side of the ring in the lasso structure and lock the tail into the ring, generating the [F19S] and [Y20I] variants. The choice of the substituting amino acids at these positions was based on the systematic amino acid substitution study by Severinov and co-workers, which showed that these substitutions did not prevent the production, maturation and export of MccJ25, but abolished its antibacterial and RNAP inhibition activities.^[10] In addition, we performed deletions and insertions in the amino acid sequence in order to decrease or increase the size of the macrolactam ring ([ΔV6] and [insA5-6]), shorten the Tyr9–Ser18 loop located above the ring ([ΔG12-G14] and [ΔF10-V11]), and shorten or extend the C terminus ([ΔG21], [insG22], [insD22], [insF22], [insF22–N23]). The choice of the variants [insF22] and [insF22–N23] was based on the C-terminal sequence of capistrin, which shows a longer tail stretching out below the macrolactam ring.^[15] Finally, given the importance of the C-terminal Gly21 residue in MccJ25 structure and activity,^[10,18] this residue was substituted for Tyr, Val, Asn, Asp, Glu, Arg and Lys, seven residues that had been shown not to

affect MccJ25 production but to result in different effects on its antibacterial activity and RNAP inhibition.^[10] The relative amounts of MccJ25 and the variants produced were measured by direct LC-MS analysis of culture supernatants (Figure 2A).

Most of the 18 variants initially designed were detected in the raw supernatants. The variant $[\Delta G12-G14]$ could be detected only after enrichment by solid phase extraction (SPE). Five peptides resulting from substitutions of the C-terminal Gly21 ($[G21R]$, $[G21K]$, $[G21D]$, $[G21E]$ and $[G21N]$) were generated with a yield similar to that of MccJ25. For the other variants, the production yields were 1) two to tenfold decreased for $[G21Y]$, $[\text{insA5-6}]$ and $[\Delta F10-V11]$, 2) 20 to 200-fold decreased for $[\Delta G21]$, $[\text{insG22}]$, $[\text{insD22}]$, $[F19S]$ and $[Y20I]$, and 3) more than 1000-fold decreased for $[\Delta G12-G14]$ (Figure 2A). The four variants $[G21V]$, $[\Delta V6]$, $[\text{insF22}]$ and $[\text{insF22-N23}]$ were not observed by LC-MS in any of the conditions used. Therefore, they were not included in further studies.

Detection and analysis of degradation products of MccJ25 and its variants

In addition to the expected peptides, several degradation products were detected in the supernatants and the corresponding SPE fractions (Figure 2B, C, and Supplementary Table S2). For MccJ25, two main hydrolysed peptides were detected, with monoisotopic masses of 2124.0 Da (+18 Da mass increment from MccJ25) and 1954.0 (–152 Da mass increment from MccJ25). LC-MS/MS experiments allowed us to assign them to $\{G1V11/G12-G21\}$ and $\{G1V11/G14-G21\}$, respectively (see nomenclature in the experimental section and Figure S1). As observed for MccJ25,^[5b] the two peptides generated by hydrolysis remained associated due to the steric entrapment of the C-terminal tail within the macrolactam ring. The +18 Da mass increment in certain product ions detected in the MS/MS spectra allowed us to unambiguously assign the hydrolysis sites (Figure S1). Similar hydrolysis profiles were detected for the $[G21X]$ variants ($X=Y, R, K, D, E, N$). By contrast, the variants $[\text{insA5-6}]$ and $[\Delta G21]$ displayed a more extended hydrolysis profile, with multiple cleavages in the Phe9–Pro16 region (Figure 2C, Table S2) and no fragments consisting of two-peptide species associated through steric entrapping. The specific hydrolysis profiles of these two variants suggested that they displayed a branched-cyclic structure rather than a lasso fold. The variant $[\Delta F10-V11]$ also showed a +118 Da two-peptide species corresponding to hydrolysis at the Gly10–Ile11 peptide bond, as revealed by LC-MS/MS (data not shown). In addition, two short peptides corresponding to tail segments were detected.

Similar hydrolysis profiles were detected for the $[G21X]$ variants ($X=Y, R, K, D, E, N$). By contrast, the variants $[\text{insA5-6}]$ and $[\Delta G21]$ displayed a more extended hydrolysis profile, with multiple cleavages in the Phe9–Pro16 region (Figure 2C, Table S2) and no fragments consisting of two-peptide species associated through steric entrapping. The specific hydrolysis profiles of these two variants suggested that they displayed a branched-cyclic structure rather than a lasso fold. The variant $[\Delta F10-V11]$ also showed a +118 Da two-peptide species corresponding to hydrolysis at the Gly10–Ile11 peptide bond, as revealed by LC-MS/MS (data not shown). In addition, two short peptides corresponding to tail segments were detected.

Lasso or branched-cyclic structure of MccJ25 variants

The collision-induced dissociation (CID) spectra of doubly charged ions of MccJ25 and its variants were used as indicators of the lasso or non-lasso structure of the peptides (Figure 3). Indeed, gas-phase fragmentation of MccJ25 triggers two-peptide product ions that result from one or two bond cleavages within the Phe9–Pro16 region.^[4b,c,5] These product ions

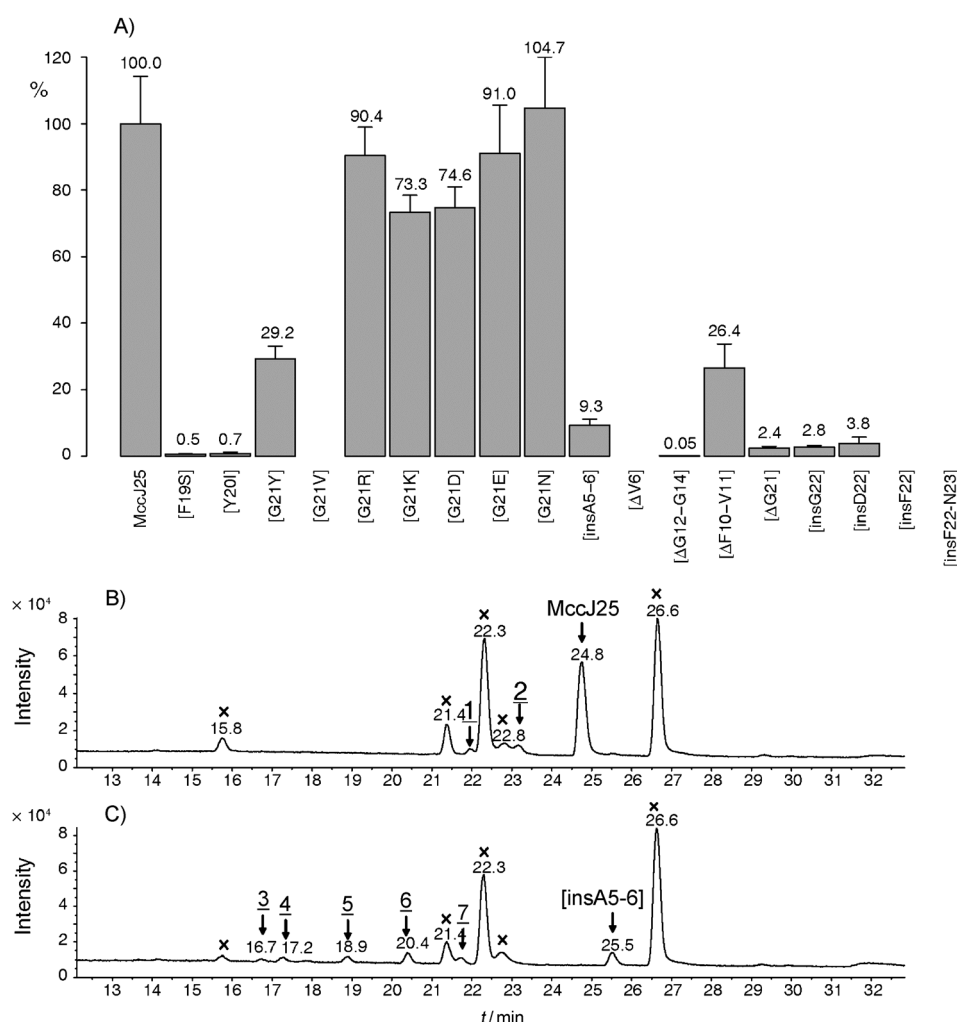


Figure 2. A) Relative intensity of MccJ25 and its variants quantified by LC-MS analysis of the raw supernatants (or after SPE purification for $[\Delta G12-G14]$). The mean values corresponding to triplicate cultures are written at the top, and the error bars correspond to standard deviations. B), C) Typical LC-MS chromatograms of raw supernatants of the strains *E. coli* MC4100 harbouring the plasmids pTUC202-MccJ25 (B) and pTUC202-[insA5-6] (C). The peaks corresponding to the expected peptides are annotated, while hydrolysed peptides are denoted from 1 to 7 (see identification in Table S2). The peaks with “x” notations correspond to non-peptidic molecules detected in all supernatants.

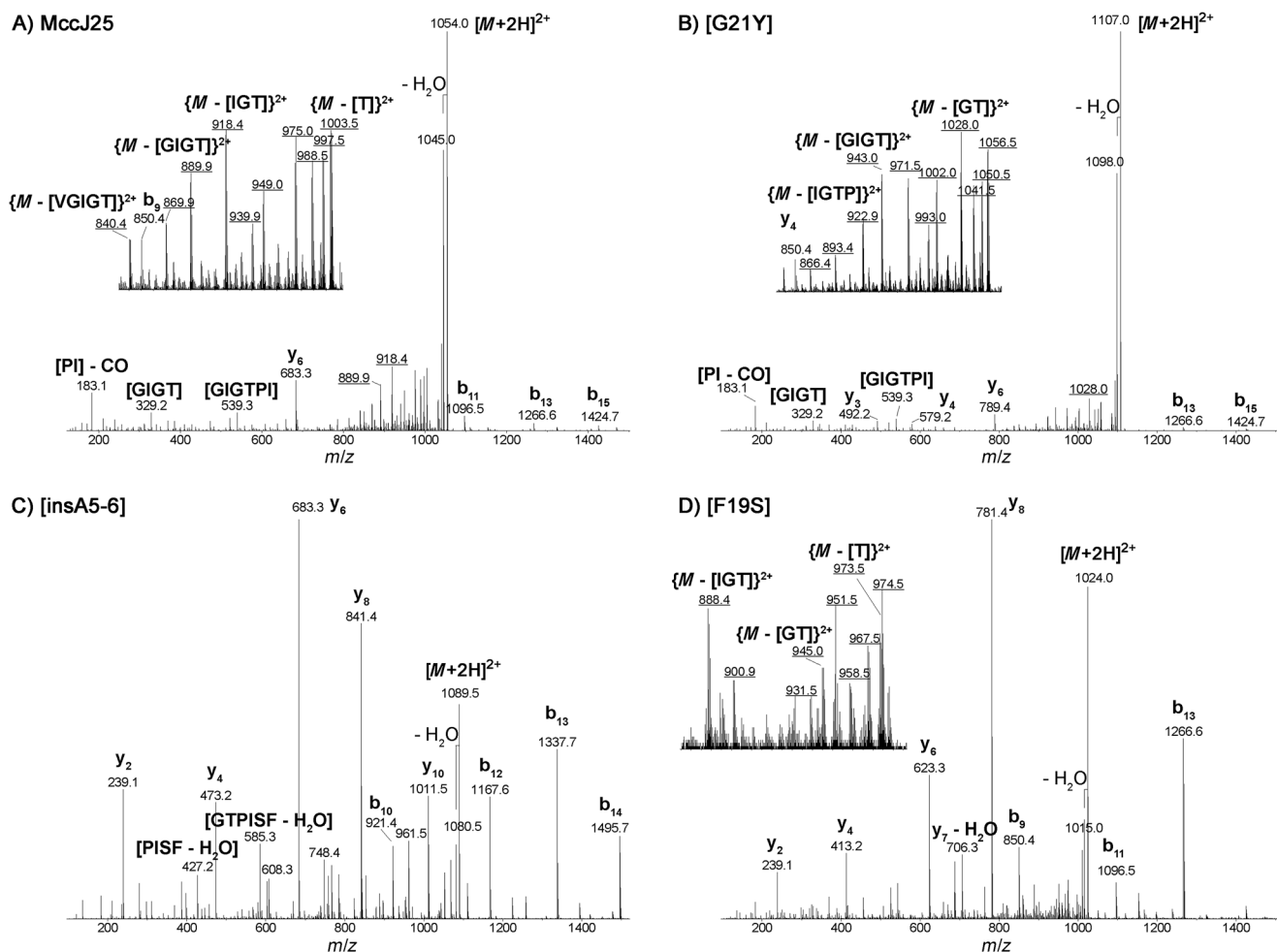


Figure 3. LC-MS/MS spectra of the doubly charged MccJ25 and its variants, corresponding to CID using a 40 V collision voltage. A) MccJ25, B) [G21Y], C) [insA5–6], D) [F19S]. The m/z ratios corresponding to two-peptide product ions are underlined (see nomenclature in the experimental section).

constitute a diagnostic pattern of the lasso structure and allow the differentiation of MccJ25 from its non-lasso topoisoform MccJ25-lcm, although this criterion cannot be generalized for all lasso peptides.^[5a] As expected, the CID spectrum of the doubly charged MccJ25 showed such product ions together with complementary y/b ion series corresponding to fragmentations in the C-terminal tail (Figure 3A). MccJ25 variants adopted three different behaviours upon CID. On one hand, the [G21X] variants ($X=Y, R, K, D, E, N$) together with [Δ F10–V11], [Δ G12–G14], [insG22] and [insD22] revealed a fragmentation pattern similar to that of MccJ25, with abundant two-peptide product ions indicative of a lasso-structure, together with the complementary y/b ion series corresponding to fragmentations in the C-terminal tail (Figure 3B for [G21Y], and Figure S2 for the other variants). On the other hand, [insA5–6], [Y20I] and [Δ G21] showed only y/b series that corresponded to fragmentations in the C-terminal tail, but no two-peptide product ions, thus suggesting a non-lasso structure (Figure 3C for [insA5–6] and Supplementary Figure S2 for the other variants). Finally, [F19S] showed mainly y/b series corresponding to fragmentations in the C-terminal tail, together with minor two-peptide product ions (Figure 3D). The CID pattern of [F19S] suggests a

lasso structure where the two-peptide product ions are disfavoured, due to the reduced steric hindrance at one side of the ring that results from the F19S substitution.

Furthermore, MccJ25, MccJ25-lcm and the MccJ25 variants were subjected to digestion with carboxypeptidase Y, an exopeptidase that releases amino acids from the C terminus. As reported recently by Marahiel and co-workers,^[2] MccJ25 was revealed to be resistant to carboxypeptidase Y (Figure 4A, B). This property can be attributed to the poor accessibility of the threaded C-terminal segment. In contrast, MccJ25-lcm was quickly digested by carboxypeptidase Y after a few minutes (Figure 4C and D). Resistance or sensitivity to carboxypeptidase Y was therefore used as a criterion by which to distinguish lasso from branched-cyclic topologies. The variants [Y20I], [insA5–6] and [Δ G21] were found to be sensitive to carboxypeptidase Y digestion, while all the other variants were resistant (Table 1). For MccJ25, a minor species corresponding to an 81 Da loss was detected after digestion. LC-MS/MS analysis of the triply charged ion of this species at m/z 676 allowed us to assign it to a two-peptide species {G1–F10/G12–G21} resulting from a double cleavage in MccJ25 loop at the Phe10–Val11 and Val11–Gly12 peptide bonds (Supplementary Figure S3).

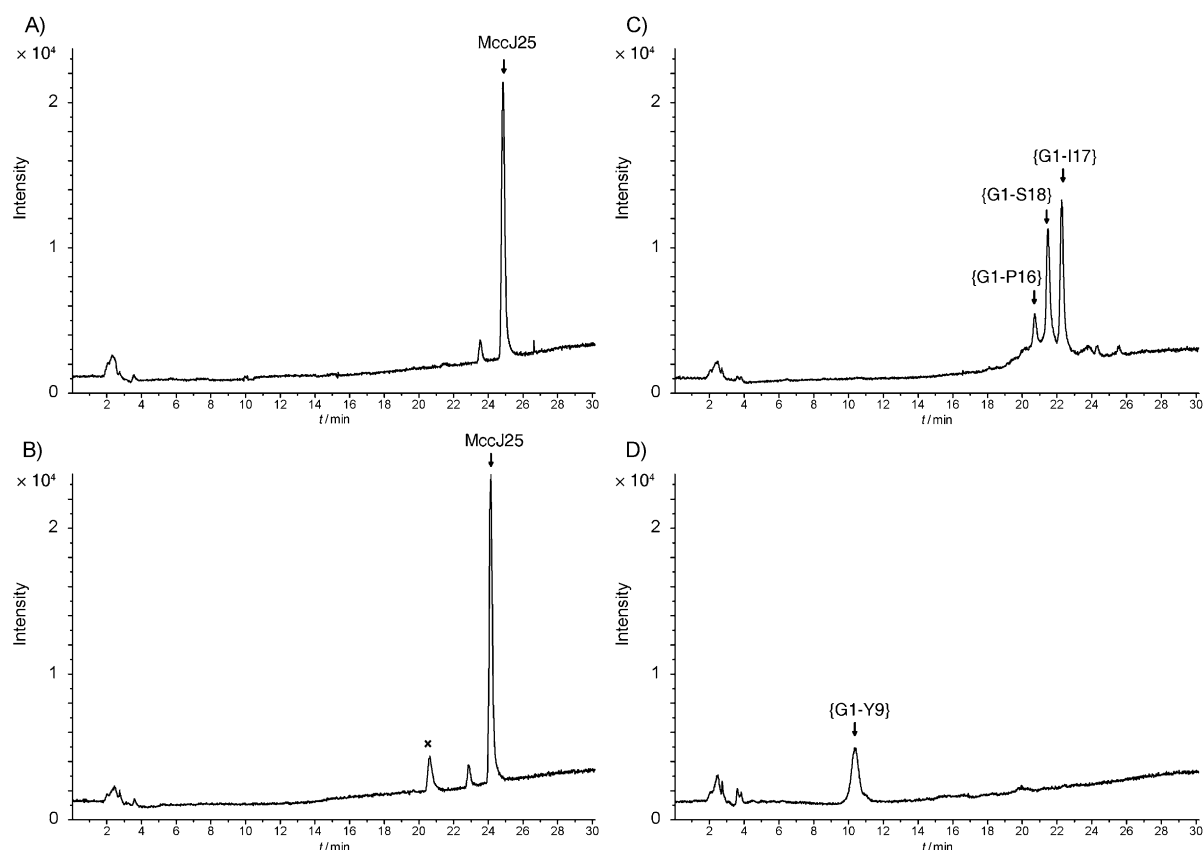


Figure 4. LC-MS chromatograms and main species detected after 1 min (A, C) and 180 min (B, D) digestion with carboxypeptidase Y of MccJ25 (A, B) and MccJ25-lcm (C, D). The peak noted “x” in Figure 4D corresponds to MccJ25–81 Da, assigned to {G1–F10/G12–G21} (see Figure S3).

Table 1. Indicators of the topology and antibacterial activity (measured against *Salmonella enterica* sp. *enterica* serotype Enteritidis) of MccJ25 and the variants produced in this study (concentrated SPE fractions or pure peptides). The highest estimated concentrations of the SPE fractions tested by the agar diffusion method correspond to LC-MS quantification using a calibration curve constructed from MccJ25 standard solution, while for pure peptides, the concentrations were determined by HPLC-UV.

	Two-peptide product ions ^[a]	Resistance to carboxypeptidase Y	Topology	+ / –	Nature of sample, highest estimated concentration tested [μM] and inhibition diameters [mm] measured by the agar diffusion method ^[b]	Antibacterial activity	MIC [μM] ^[c]
MccJ25	+	+	lasso	+	pure peptide	30.0/20 to 0.03/6	0.008
MccJ25-lcm	–	–	branched-cyclic	–	pure peptide	30.0/0	
[F19S]	+	+	lasso	+	concentrated SPE fraction	0.9/6	
[Y20I]	–	–	branched-cyclic	–	concentrated SPE fraction	1.4/0	
[G21Y]	+	+	lasso	–	concentrated SPE fraction	4.4/0	
[G21R]	+	+	lasso	–	pure peptide	30.0/0	n.a.
[G21K]	+	+	lasso	–	pure peptide	30.0/0	n.a.
[G21D]	+	+	lasso	+	pure peptide	30.0/7	2.5
[G21E]	+	+	lasso	–	pure peptide	30.0/0	n.a.
[G21N]	+	+	lasso	+	pure peptide	30.0/18	0.075
[insA5–6]	–	–	branched-cyclic	–	pure peptide	30.0/0	
[ΔG12–G14]	+	+	lasso	–	concentrated SPE fraction	0.1/0	
[ΔF10–V11]	+	+	lasso	–	concentrated SPE fraction	4.0/0	
[ΔG21]	–	–	branched-cyclic	–	concentrated SPE fraction	0.4/0	
[insG22]	+	+	lasso	+	concentrated SPE fraction	2.5/10	
[insD22]	+	+	lasso	+	concentrated SPE fraction	3.4/9	

[a] Two-peptide product ions detected with very low intensity, [b] MccJ25 antibacterial activity was detectable in the 0.03–30 μM concentration range under the conditions tested, [c] n.a.: not active up to 50 μM.

This species was not detected in the control reaction without carboxypeptidase Y, suggesting an unexpected endopeptidase

activity of the enzyme. Such a side reaction has been previously reported for carboxypeptidase Y preparations from baker's

yeast and is proposed to result from the presence of contaminating amounts of yeast proteinase.^[19] This –81 Da loss was also observed for MccJ25 variants that were resistant to carboxypeptidase Y (data not shown).

Taken together, the CID patterns and carboxypeptidase Y digestion results indicated a lasso structure for the variants [G21X] (X = Y, R, K, D, E, N), [F19S], [Δ F10–V11], [Δ G12–G14], [insG22] and [insD22], while the variants [Y20I], [insA5–6] and [Δ G21] appeared to adopt an unknotted branched-cyclic structure (Table 1). Therefore, the lasso structure of MccJ25 is maintained through the two C-terminal residues located below the ring (Tyr20–Gly21) and not only by Tyr20, and the size of the ring is critical to provide the steric hindrance that locks the structure in its knotted topology. By contrast, the loop region and the C-terminal tail stretching out below the ring are tolerant to deletions and insertions, although the yields of the lasso peptides generated decrease.

NMR spectroscopy

In order to gain further structural information on lasso and branched-cyclic variants of MccJ25, three variants were analysed by NMR and compared with MccJ25. The lasso peptides [G21D] and [G21R] were analysed in [D₃]MeOH, while the branched-cyclic [insA5–6], insoluble in this solvent, was studied in [D₆]dimethylsulfoxide (DMSO). As previously reported,^[4] the ¹H spectra of MccJ25 showed significant chemical shift dispersion both in [D₆]DMSO (Table S3) and [D₃]MeOH (Table S4), with amide proton chemical shifts ranging from 6.7 to 9.6 ppm. This indicated a well-defined conformation. Moreover, several long-range NOEs that are typical of the lasso structure^[4] were observed, including 1) the H α –H α connectivity between Pro7 and Phe19 characteristic of the Val6–Pro7/Phe19–Tyr20 antiparallel β -sheet, 2) the correlations between the amide proton of Tyr20 and the H α of Gly2, Gly4 and the side chain protons of Val6 and/or Glu8 located in the macrolactam ring, 3) the correlations between the H α or H β of Phe19 on the one hand and the amide protons of Gly4 and Glu8 located in the macrolactam ring on the other hand (Figures S4A and S5A).

Similarly to MccJ25, the variants [G21D] and [G21R] exhibited the chemical shift dispersion and NOE connectivities characteristic of the lasso fold (Tables S6 and S7, Figure S5). The overall chemical shift and NOE patterns were very close for the two peptides, suggesting that the intrinsic characteristics of the amino acid substituting G21 were without major effect on the global conformation of the peptides. However, local chemical shift variations as compared to MccJ25 were observed in both the C-terminal region and the macrolactam ring (Figure S6). In addition, several long-range NOEs differed in [G21R] as compared to MccJ25 and [G21D]. Indeed, the Tyr20 amide proton was correlated with the H α of Gly2 and Gly4 and the H β of Val6 for both MccJ25 (Figure S5A) and [G21D] (Figure S5B), while it was correlated with the H α of Pro7, H β of Val6 and H γ of Glu8 for [G21R] (Supplementary Figure S5C). This result indicates that introducing a positive charge and/or a bulky side chain at the C terminus generates a local structural change.

By contrast, the amide protons of [insA5–6] were in a more restricted chemical shift range (7.3–8.6 ppm) reminiscent of that reported for MccJ25-lcm,^[4c] which suggested an unfolded structure (Table S5). Moreover, the NOESY spectrum did not show the long-range NOEs typical of the lasso structure, but only sequential NOEs (Figure S4B), thus confirming that increasing the size of the macrolactam ring results in a non-lasso variant.

Structure–activity relationships of MccJ25 variants

The antibacterial activities of MccJ25 and the generated variants were examined against *Salmonella enterica* sp. *enterica* serotype Enteritidis, a strain highly sensitive to MccJ25 (minimal inhibitory concentration (MIC) in the nM range). Either purified peptides or SPE fractions were tested using the agar diffusion method (Table 1). Under the conditions used, MccJ25 was active in the 0.03–30 μ M range. In addition, in order to better compare the antibacterial activity of MccJ25 with that of its variants, MICs were measured for the variants produced with production yields similar to that of MccJ25, that is, [G21X] (X = Arg, Lys, Asp, Glu, Asn). The peptides MccJ25, [G21D], [G21N], [insG22], [insD22] and [F19S] showed antibacterial activity, while the other variants were devoid of activity (Table 1). For certain variants, the antibacterial activity at high peptide concentrations could not be tested due to the very low production yields. Therefore, the absence of activity for certain peptides such as [Δ G12–G14] (tested at an estimated concentration of 0.1 μ M) might reflect either a total loss of activity or a very low activity. Taken together, the antibacterial activity measurements showed that 1) the lasso folding is a prerequisite for activity since all active peptides adopt a lasso structure, 2) shortening the Tyr9–Ser18 loop abolishes the activity while keeping the lasso scaffold, 3) extending the C-terminal tail below the macrolactam ring maintains both the lasso structure and the activity (although decreased), 4) the residue type at the C terminus strongly influences the antibacterial activity. For the latter point, the introduction of small neutral residues at position 21 was shown to maintain a significant antibacterial activity, illustrated by the 75 nM MIC measured for [G21N]. By contrast, negatively charged residues reduced or abolished the activity as a function of the size of the side-chain, as shown by the 2.5 μ M and > 50 μ M MICs measured for [G21D] and [G21E], respectively, while positively charged residues abolished it.

Discussion

The three-dimensional structure of MccJ25 can be divided into three regions, the eight-residue macrolactam ring at the N terminus, the loop region encompassing residues Tyr9 to Ser18, and the threaded Phe19–Gly21 tail. In order to identify the sequence determinants of the lasso scaffold, we rationally designed mutants in order to alter the three regions individually. This approach is distinguished from the systematic structure–activity study reported previously by Severinov and co-workers,^[10] in which hundreds of singly substituted mutants were generated by saturation mutagenesis. We also developed a

robust and efficient protocol based on mass spectrometry, NMR and enzymatic digestion techniques to assess the formation of the lasso scaffold. Our results clearly show that modifications of the size of each region are feasible but have different effects on the topology. Extending the macrolactam ring ([insA5–6]) and shortening the threaded tail ([ΔG21]) result in variants with a branched-cyclic topology, while reduction of the loop size ([ΔG12–G14], [ΔF10–V11]) and extension of the threaded tail ([insG22], [insD22]) are compatible with the lasso fold. The lasso variants generated here are reminiscent of naturally occurring lasso peptides, such as capistrin and lariatin, which are distinguishable from MccJ25 by their shorter loop and longer threaded tail.^[15,20] Attempts to get a MccJ25 variant with a decreased size of the macrolactam ring failed. This is likely due to steric constraints that do not permit formation of a seven-residue ring knotted structure, a motif that has not been observed in any known lasso peptide to date. The noose structure of MccJ25 is mainly maintained by steric constraints imposed by Phe19 and Tyr20 that straddle the ring. Systematic mutagenesis scanning demonstrated that these two residues, and in particular Tyr20, tolerate relatively few modifications for the production of MccJ25, *in vivo*.^[10] Therefore, we produced [F19S] and [Y20I] in order to analyse their structures. Not surprisingly, the former is a lasso peptide, whereas the latter is a branched-cyclic peptide. Phe19 does not participate in maintaining the lasso knot, but appears to prevent the C terminus from slipping down through the ring. It thus contributes largely to the stabilization of two-peptide species generated upon cleavages of MccJ25 in the loop region. This is illustrated by the low abundance of two-peptide product ions in the MS/MS spectrum of [F19S] (Figure 3D). Therefore, Phe19 may contribute to fix a well-defined conformation of the loop. Not surprisingly, retaining the bulky residue that lies below the ring (Tyr20) is the key to keep the peptide knotted. Notably, in contrast to [Y20I], the [R15A/F16A] variant of capistrin displays a lasso structure that is thermally unstable and is converted into its topoisomer upon heating.^[17] This thus suggests that the length of the threaded tail is an additional element that helps retain the knotted topology. In MccJ25[Y20I], the short inserted tail composed of only three residues would facilitate unthreading upon removal of the “plug” residue. The loss of the lasso fold upon removing Gly21 shows that residue Tyr20 is not sufficient alone to block the C-terminal tail in the ring, but that the C-terminal residue acts as an additional plug. This trend can rely on steric constraints and/or stabilization of the knotted topology by a salt bridge between the C-terminal carboxylate and His5. To gain insights into the role of Gly21, it was substituted for a range of amino acids with different steric and charge effects (Tyr, Asn, Asp, Glu, Arg, Lys). The corresponding MccJ25 variants were found to adopt a lasso structure, which privileges the role of the steric constraints over the electrostatic interaction between the C terminus and the imidazole group of His5, and demonstrates the high tolerance of the maturation machinery to the nature of the side chain at position 21.

Five out of the fourteen MccJ25 variants studied exhibited antibacterial activity, all of which are lasso peptides (Table 1). This confirms that the lasso structure is a prerequisite for bio-

logical activity. Some results obtained in this study differ from those described by Severinov and co-workers,^[10] where the variants [G21D], [G21R], [G21K] and [G21N] inhibited RNAP but lacked antibacterial activity, while [F19S] had neither inhibitory activity of RNAP nor antibacterial activity. The discrepancy between the two studies could be attributed to differences in the bacterial strains used to assess the antibacterial activity of the peptides (*Salmonella enterica* sp. *enterica* serotype Enteritidis in the present study, *Shigella flexneri* clinical isolate BK#12440 in the study from Severinov et al.). Another possibility to explain these differences resides in the peptide concentrations used, since Severinov et al. used raw supernatants without peptide quantification, whereas prepurified fractions or pure peptides were used here. An elegant strategy to generate and screen the active/inactive character of MccJ25 variants has been recently proposed by Pan and Link.^[16b] This method is based on an orthogonal control of the expression of *mcjA* and *mcjD*, permitting independent control of MccJ25 production and export/immunity. However such an approach does not allow quantification of the activity of the generated variants. Here we quantified the MccJ25 variants by LC-MS. This method is limited by alterations in the ionization efficiency upon modifications of the MccJ25 amino acid sequence, but can provide a good estimation of the relative concentration in the fractions tested. In addition, a measurement of the MIC was performed for the variants produced with high production yields, with a quantification of the peptides by HPLC-UV. Shortening the size of the loop resulted in lasso-structured variants devoid of antibacterial activity, although a weak activity cannot be excluded for [ΔG12–G14] since it was only tested at an estimated concentration of 0.1 μM. Modifications in the loop might alter the interaction with the siderophore receptor FhuA that is involved in peptide uptake in target cells.^[6] Similarly, when MccJ25 was cleaved at Phe10–Val11 by thermolysin, the result was a two-peptide species that displays a very low antibacterial activity.^[5b] Finally, exchange of Gly21 for acidic (Asp) or basic residues (Lys, Arg) resulted in opposite effects on the antibacterial activity, indicating that the presence of a positive charge at the C terminus abolishes the antibacterial activity. The loss of activity cannot be attributed to a destabilization of the lasso structure since our data demonstrate that all the [G21X] variants produced adopt a lasso structure. Nevertheless, a comprehensive comparison of chemical shifts and NOE patterns between MccJ25 and its variants [G21D] and [G21R] (Figures S5, S6 and Tables S4, S6, S7) revealed that [G21R] exhibits local structural changes compared to MccJ25 and [G21D], affecting both the C-terminal and ring regions involved in RNAP inhibition.^[10–11] The addition of one residue at the C terminus, either neutral ([insG22]) or negatively charged ([insD22]) did not abolish the antibacterial activity, which shows that this region, critical for RNAP inhibition, is however tolerant to extensions of the C-terminal tail. This trend is supported by the RNAP inhibition activity reported recently for capistrin, which has a longer threaded tail as compared to MccJ25.^[21]

Here we report for the first time the identification of various cleaved forms of MccJ25 from the culture supernatants. The cleavage mainly occurs in the flexible β-hairpin region, which

is also the region sensitive to thermolysin.^[5b] Similarly, a hydrolysed form consisting of a C-truncated peptide was described for propeptin.^[22] Thus, peptidase cleavage of lasso peptides inside the producing bacteria seems to be a common scenario, although its physiological function remains unknown. The difference in the hydrolysis profiles observed between MccJ25 and propeptin could be attributed to their different structures, the flexible regions being the most accessible to digestion by peptidases.

The observation of a lasso structure for a given variant indicates that the maturation process is tolerant to this mutation and that the resulting lasso structure is also thermodynamically stable. In contrast, the observation of a branched-cyclic structure indicates that either the complete maturation process is incompatible with the mutation and/or that the matured lasso structure is unstable and rapidly unfolds as a branched-cyclic peptide. Three branched-cyclic MccJ25 variants were produced in vivo ([Y20I], [Δ G21], [insA5–6]). Having an extended structure, these peptides are highly sensitive to degradation by proteases, as shown by the degradation observed in the supernatants (Figure 2C, Table S2). One intriguing question emerging here is thus how these branched-cyclic peptides are protected and transported. On the basis of biochemical studies, the maturation enzymes ensuring the lasso folding form a complex and probably associate with the ABC-transporter McjD at the outer membrane.^[23] Such an organization would facilitate coupling of McjA processing and transport of the mature MccJ25, which prevents the contact of McjA or MccJ25 with cytoplasmic proteases. It is conceivable that McjD displays substrate specificity for knotted structures. Therefore we hypothesise that the branched-cyclic variants are initially synthesised as lasso forms that would be maintained by the enzymatic machinery, followed by unfolding once outside the cells. The unfolding process may be kinetically and/or thermodynamically favoured without the protection provided by enzymatic machinery. Nevertheless, we demonstrate here the versatility of the production system of MccJ25 in vivo to generate both lasso and branched-cyclic peptides. Insights into the sequence determinants of lasso formation and bioactivity will facilitate further bioactive peptide engineering using the lasso structure as template.

Experimental Section

Chemicals, bacterial strains and culture media: The oligonucleotide primers were synthesized by Eurofins MWG Operon (Supplementary Table S1). Carboxypeptidase Y from *Saccharomyces cerevisiae* was purchased from Sigma. The synthetic branched-cyclic peptide MccJ25-lcm was obtained from Genepep (Saint-Clément-de-Rivière, France) with a purity > 95%. *E. coli* XL10-Gold (kanamycin-resistant) was purchased from Agilent and used as host cell for plasmid propagation. *E. coli* MC4100 harbouring the wild-type or mutated pTUC202 plasmid^[13] (chloramphenicol-resistant) was used for the production of MccJ25 and its derivatives. *Salmonella enterica* sp. *enterica* serotype Enteritidis was used for antibacterial assays. Bacteria were grown in LB or M63 (KH₂PO₄ (13.6 g L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (2 g L⁻¹), casamino acids (1 g L⁻¹), supplemented with 0.2% glucose, MgSO₄ (2 mM) and vitamin B1 (1 mg L⁻¹), pH 7) cul-

ture media containing chloramphenicol (34 μ g mL⁻¹) or kanamycin (50 μ g mL⁻¹).

Site-directed mutagenesis: Site-directed mutagenesis was performed on the plasmid pTUC202 using the Quick-Change II XL kit (Agilent) following the manufacturer's instructions. PCR reactions were carried out with PfuUltra® High Fidelity DNA polymerase in an Eppendorf MasterCycler (Eppendorf) by the following program: initial denaturation at 95 °C for 1 min, followed by 18 cycles of 95 °C for 50 s, 60 °C for 50 s, 68 °C for 10 min, and a final extension at 68 °C for 7 min. The PCR product was treated with DpnI for 1 h at 37 °C and used to transform kanamycin-resistant *E. coli* XL10-Gold ultracompetent cells. The mutated sites were confirmed by DNA sequencing (Eurofins MWG Operon).

Peptide production and purification: The relative amount of MccJ25 or its variants was measured from triplicate cultures. A pre-culture of *E. coli* MC4100 harbouring the wild-type or mutated pTUC202 plasmid was incubated for 16 h at 37 °C in 10 mL LB. M63 agar (10 mL) was inoculated to an optical density at 620 nm (OD₆₂₀) value of 0.01, measured on a S1200 Spectrawave spectrometer (Biochrom WPA), and incubated at 37 °C until an OD₆₂₀ value of 1.2–1.4 was reached. After centrifugation and filtration through 0.2 μ m filters, raw supernatants (200 μ L) were taken out for direct LC-MS analysis to rapidly estimate the amount of peptides produced. The remaining supernatants were prepurified by SPE on SepPak Plus C8 1 cc cartridges (Waters). Each cartridge was conditioned with MeOH (10 mL), water + 0.1% formic acid (FA) (10 mL) and supernatant (8 mL) were loaded. After washing with water + 0.1% FA (10 mL) and water + 0.1% FA/methanol (9:1 v/v, 5 mL), the peptide was eluted with methanol (2 mL). The eluted fractions were dried under vacuum and resuspended either in 0.5 mL (for variants [G21V], [Δ V6] and [Δ G12–G14]), 1 mL (for variants [F19S] and [Y20I]), or 3 mL (other mutants) of water + 0.1% FA/acetonitrile (9:1 v/v), depending on the LC-MS quantification in the raw supernatants. For large-scale production of [insA5–6], [G21R] and [G21D], 1 L M63 was inoculated to an OD₆₂₀ value of 0.01 and incubated for 16 h at 37 °C. Cultures were harvested by centrifugation and supernatants were prepurified by SPE on 35 cc SepPak C8 cartridges (Waters). The cartridge was conditioned with methanol, acetonitrile and water + 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), before loading the supernatant. After washing with water + 0.1% TFA, successive elutions were achieved using 20, 30 and 40% acetonitrile in water + 0.1% TFA. The elution was monitored by absorbance measurements at 226 nm. The SPE fractions were concentrated and applied onto a reversed-phase HPLC Capcell C18 semi-preparative column (7 $\times$ 300 mm, 120 Å, 5 μ m, Interchim). Elution was performed applying the following gradient of water + 0.1% TFA (solvent A) and acetonitrile + 0.1% TFA (solvent B) at a flow rate of 1 mL min⁻¹: linear increase from 0% B to 60% B within 30 min followed by linear increase to 100% B in 5 min. Concentrations of the purified peptide were measured by HPLC with UV detection (absorbance measurement at 226 nm), using a standard MccJ25 solution as reference. The peptides were evaporated to dryness under vacuum and stored at –20 °C.

Antibacterial activity: Antibacterial activities of MccJ25 and its variants were assessed against *Salmonella enterica* sp. *enterica* serotype Enteritidis, using the agar diffusion method. M63 soft agar (5 mL) was inoculated with bacteria (10⁶ CFU) and deposited onto an M63 agar layer in a Petri dish. After cooling, SPE fractions (raw or concentrated, 10 μ L) or purified peptides (30 μ m) were deposited. The Petri dishes were incubated overnight at 37 °C, and the antibacterial activities were determined from the inhibition diameters measured. Alternatively, the antibacterial activities were measured

by using a liquid growth inhibition assay in poor broth (PB: 1% bactotryptone, 0.5% NaCl w/v). A mid-logarithmic growth phase culture of bacteria (OD_{620} value between 0.3–0.4) was diluted in PB to an OD_{620} of 0.001. Diluted culture (90 μ L) was introduced to a 96-well sterile microplate and serial dilutions (10 μ L) of pure MccJ25 and [G21X] variants (X=R, K, D, E, N) were added. Each peptide dilution was tested in triplicate. The plates were incubated for 16 h at 37 °C under shaking, and the OD_{620} value was measured with a Multiskan FC microplate reader (Thermo Scientific). The MICs were determined as the lowest peptide concentrations showing complete inhibition of the bacterial growth.

LC-MS and LC-MS/MS analysis: The culture supernatants, SPE fractions and carboxypeptidase Y digests were analysed by LC-MS using an Ultimate 3000 Micro-HPLC system (Dionex) connected to an ESI-Qq-TOF Q-STAR Pulsar mass spectrometer (Applied Biosystems) equipped with an IonSpray source. The separation was achieved in a Zorbax 300 SB C8 column (1 $\times$ 150 mm; 300 Å; 3.5 μ m, Agilent) using the following gradient of water + 0.1% FA (solvent A) and acetonitrile (solvent B) at 40 °C and 40 μ L min⁻¹: linear increase from 0% B to 60% B within 30 min followed by a linear increase to 100% B in 5 min. The relative quantification of MccJ25, and its variants was performed using the LC-MS reconstruct tool in the Analyst QS software (Applied Biosystems), which integrated peak areas corresponding to all charge states of the peptides, taking into account the multiply protonated species as well as the NH_4^+ - and K^+ -adducts. In LC-MS/MS experiments, the doubly or triply protonated ions of MccJ25 and its variants were selected for CID, with an excitation voltage of 40 V and 22.5 V for the doubly and the triply protonated species, respectively.

NMR spectroscopy: MccJ25 and the selected variants were analysed by NMR using a peptide solution in [D₃]MeOH (1 mM, 500 μ L, MccJ25, [G21D] and [G21R]) or in [D₆]DMSO (2 mM, MccJ25 and [insA5–6]). NMR experiments were acquired at 298 K on Bruker AVANCE 400 and AVANCE II 600 spectrometers, equipped with a ¹H-broad-band reverse probe with Z-gradient and a triple resonance ¹H-¹³C-¹⁵N TXI cryoprobe with Z-gradient, respectively. Spectra were processed with TopSpin 2.1 (Bruker) and analysed with the CcpNmr Analysis program produced by Collaborative Computing Project for NMR (CCPN).^[24]

Enzymatic digestion: SPE fractions or purified peptides (0.5 mg mL⁻¹) were diluted 4 times in pyridine acetate buffer (0.1 M, pH 5.6, final volume 200 μ L) and incubated at 26.5 °C upon agitation in the absence or in the presence of carboxypeptidase Y (5 μ g mL⁻¹). Two digestion reactions were done for each peptide, the former being stopped after 1 min and the latter after 3 h by adding of glacial acetic acid (10 μ L).

Nomenclature: The peptides resulting from hydrolysis of MccJ25 and its variants are noted {Ax-By}, where A and B represent the one-letter amino acid of the N- and C-terminal extremities, respectively, of the two peptides and x and y represent their respective positions in the sequence. The two peptide entities resulting from single or multiple hydrolysis, when associated through steric entrapment, are written {Ax-By/Cz-Dt} where A, B, C, D represent the one-letter amino acid of the extremities of the two peptides and x, y, z, t indicate their respective positions in the sequence. The two-peptide product ions generated by CID are written {M-[X]}ⁿ⁺, where X indicates the internal segment lost in the y/b-type fragmentation and n corresponds to the charge state. The y/b internal product ions are noted in brackets.

Acknowledgements

This work was supported by the ANR grant LASSO (BLAN-NT09-692063). We thank the mass spectrometry and NMR platforms (MNHN, Paris) for access to the spectrometers, together with Manon Vandervennet for careful technical assistance in bacteriology. Financial support from the TGE RMN THC Fr3050 for conducting the research is gratefully acknowledged. We would like to thank the group of Pr. Mohamed A. Marahiel (Philipps-University, Marburg, Germany) for fruitful discussions.

Keywords: antimicrobial peptides • biosynthesis • genetic engineering • lasso peptides • microcin J25

- [1] K. J. Rosengren, D. J. Craik, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1211–1212.
- [2] T. A. Knappe, F. Manzenrieder, C. Mas-Moruno, U. Linne, F. Sasse, H. Kessler, X. Xie, M. A. Marahiel, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8873–8876; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8714–8717.
- [3] a) S. Rebuffat, A. Blond, D. Destoumieux-Garzón, C. Goulard, J. Peduzzi, *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 383–391; b) R. A. Salomón, R. N. Fariás, *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 7428–7435; c) P. A. Vincent, R. D. Morero, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 538–549.
- [4] a) M. J. Bayro, J. Mukhopadhyay, G. V. Swapna, J. Y. Huang, L. C. Ma, E. Sineva, P. E. Dawson, G. T. Montelione, R. H. Ebright, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12382–12383; b) K. J. Rosengren, R. J. Clark, N. L. Daly, U. Goransson, A. Jones, D. J. Craik, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12464–12474; c) K. A. Wilson, M. Kalkum, J. Ottesen, J. Yuzenkova, B. T. Chait, R. Landick, T. Muir, K. Severinov, S. A. Darst, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12475–12483.
- [5] a) S. Zirah, C. Afonso, U. Linne, T. A. Knappe, M. A. Marahiel, S. Rebuffat, J. C. Tabet, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22*, 467–479; b) K. J. Rosengren, A. Blond, C. Afonso, J. C. Tabet, S. Rebuffat, D. J. Craik, *Biochemistry* **2004**, *43*, 4696–4702.
- [6] D. Destoumieux-Garzón, S. Duquesne, J. Peduzzi, C. Goulard, M. Desmadril, L. Letellier, S. Rebuffat, P. Boulanger, *Biochem. J.* **2005**, *389*, 869–876.
- [7] a) R. E. de Cristóbal, J. O. Solbiati, A. M. Zenoff, P. A. Vincent, R. A. Salomón, J. Yuzenkova, K. Severinov, R. N. Fariás, *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 3324–3328; b) R. A. Salomón, R. N. Fariás, *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 3323–3325.
- [8] a) K. Adelman, J. Yuzenkova, A. La Porta, N. Zenkin, J. Lee, J. T. Lis, S. Borukhov, M. D. Wang, K. Severinov, *Mol. Cell* **2004**, *14*, 753–762; b) J. Mukhopadhyay, E. Sineva, J. Knight, R. M. Levy, R. H. Ebright, *Mol. Cell* **2004**, *14*, 739–751.
- [9] E. Semenova, Y. Yuzenkova, J. Peduzzi, S. Rebuffat, K. Severinov, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 3859–3863.
- [10] O. Pavlova, J. Mukhopadhyay, E. Sineva, R. H. Ebright, K. Severinov, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 25589–25595.
- [11] P. A. Vincent, A. Bellomio, B. F. de Arcuri, R. N. Fariás, R. D. Morero, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 549–551.
- [12] A. Bellomio, P. A. Vincent, B. F. de Arcuri, R. N. Fariás, R. D. Morero, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 4180–4186.
- [13] J. O. Solbiati, M. Ciacio, R. N. Fariás, J. E. Gonzalez-Pastor, F. Moreno, R. A. Salomón, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2659–2662.
- [14] S. Duquesne, D. Destoumieux-Garzón, S. Zirah, C. Goulard, J. Peduzzi, S. Rebuffat, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 793–803.
- [15] T. A. Knappe, U. Linne, S. Zirah, S. Rebuffat, X. Xie, M. A. Marahiel, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11446–11454.
- [16] a) S. J. Pan, W. L. Cheung, H. K. Fung, C. A. Floudas, A. J. Link, *Protein Eng. Des. Sel.* **2011**, *24*, 275–282; b) S. J. Pan, A. J. Link, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5016–5023.
- [17] T. A. Knappe, U. Linne, L. Robbel, M. A. Marahiel, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1290–1298.
- [18] A. Bellomio, M. R. Rintoul, R. D. Morero, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *303*, 458–462.

- [19] a) H. M. Lee, J. F. Riordan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *85*, 1135–1142; b) J. Carlsen, K. Christiansen, *Anal. Biochem.* **1985**, *148*, 542–545.
- [20] M. Iwatsuki, H. Tomoda, R. Uchida, H. Gouda, S. Hirono, S. Omura, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7486–7491.
- [21] K. Kuznedelov, E. Semenova, T. A. Knappe, D. Mukhamedyarov, A. Srivastava, S. Chatterjee, R. H. Ebright, M. A. Marahiel, K. Severinov, *J. Mol. Biol.* **2011**, *412*, 842–848.
- [22] K. Kimura, M. Yamazaki, N. Sasaki, T. Yamashita, S. Negishi, T. Nakamura, H. Koshino, *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 519–523.
- [23] D. J. Clarke, D. J. Campopiano, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2564–2566.
- [24] W. F. Vranken, W. Boucher, T. J. Stevens, R. H. Fogh, A. Pajon, M. Llinas, E. L. Ulrich, J. L. Markley, J. Ionides, E. D. Laue, *Proteins* **2005**, *59*, 687–696.

Received: November 10, 2011

Published online on January 27, 2012

Supporting information

Table S1

Primers used for site-directed mutagenesis on *mcjA* (amino acid numbering in the names refers to MccJ25). Mutated/inserted/deleted based are marked in bold and forward and reverse orientations (as referred to the 5'-3' orientation of *mcjA*) are denoted as F and R, respectively.

Name	Sequence	Size (nt)
F19S F	5' -GTGGGGATTGGTACACCTATATCT AG CTATGGCTGATATTCTG-3'	43
F19S R	5' -CAGAATATCAGCCATAG CT AGATATAGGTGTACCAATCCCCAC-3'	43
Y20I F	5' -GGGATTGGTACACCTATATCTTT CA TGGCTGATATTCTGAAAGAAGAAC-3'	50
Y20I R	5' -GTTCTTCTTTTCAGAATATCAGCCA AAT GAAAGATATAGGTGTACCAATCCC-3'	50
G21Y F	5' -GGATTGGTACACCTATATCTTTCTAT TAA CTGATATTCTGAAAGAAGAACTCTG-3'	53
G21Y R	5' -CAGAGTTCTTCTTTTCAGAATATCAG TA ATAGAAAGATATAGGTGTACCAATCC-3'	53
G21V F	5' -TGGTACACCTATATCTTTCTATG TCT GATATTCTGAAAGAAGAACTC-3'	47
G21V R	5' -GAGTTCTTCTTTTCAGAATATCAG AC ATAGAAAGATATAGGTGTACCA-3'	47
G21R F	5' -GGGATTGGTACACCTATATCTTTCTAT CG CTGATATTCTGAA-3'	42
G21R R	5' -TTCAGAATATCAG CG ATAGAAAGATATAGGTGTACCAATCCC-3'	42
G21K F	5' -TTTGTGGGGATTGGTACACCTATATCTTTCTAT AA GTGATATTCTGAAAGAAGAACT-3'	57
G21K R	5' -AGTCTTCTTTTCAGAATATC CTT ATAGAAAGATATAGGTGTACCAATCCCCACAAA-3'	57
G21D F	5' -TGGTACACCTATATCTTTCTATG ACT GATATTCTGAAAGAAGAACTC-3'	47
G21D R	5' -GAGTTCTTCTTTTCAGAATATCAG TC ATAGAAAGATATAGGTGTACCA-3'	47
G21E F	5' -GATTGGTACACCTATATCTTTCTATG AGT GATATTCTGAAAGAAGAACTCTG-3'	52
G21E R	5' -CAGAGTTCTTCTTTTCAGAATATC ACT CATAGAAAGATATAGGTGTACCAATC-3'	52
G21N F	5' -GGATTGGTACACCTATATCTTTCTAT TAA CTGATATTCTGAAAGAAGAACTCTG-3'	53
G21N R	5' -CAGAGTTCTTCTTTTCAGAATATCAG TT ATAGAAAGATATAGGTGTACCAATCC-3'	53
insA5-6 F	5' -CACAAAAGGTGGTGCAGGACAT GCA GTGCCTGAGTAT-3'	37
insA5-6 R	5' -ATACTCAGGCAC TGC ATGTCCTGCACCACCTTTTGTG-3'	37
ΔV6 F	5' -AAAGGTGGTGCAGGACAT---CCTGAGTATTTTGTGG-3'	34
ΔV6 R	5' -CCACAAAATACTCAGG---ATGTCCTGCACCACCTTT-3'	34
ΔG12-G14 F	5' -CATGTGCCTGAGTATTTTGTG-----ACACCTATATCTTTCTATGGC-3'	46
ΔG12-G14 R	5' -GCCATAGAAAGATATAGGTGT-----CACAAAATACTCAGGCACATG-3'	46
ΔF10-V11 F	5' -GCAGGACATGTGCCTGAGTAT-----GGGATTGGTACACC-3'	35
ΔF10-V11 R	5' -GGTGTACCAATCCC-----ATACTCAGGCACATGTCCTGC-3'	35
ΔG21 F	5' -TGGGGATTGGTACACCTATATCTTTCTAT---TGATATTCTGAAAGAAG-3'	37
ΔG21 R	5' -CTTCTTTTCAGAATATCA---ATAGAAAGATATAGGTGTACCAATCCCCA-3'	37
insG22 F	5' -GTACACCTATATCTTTCTATGGC GGT TGATATTCTGAAAGAAGAACTCT-3'	49
insG22 R	5' -AGAGTTCTTCTTTTCAGAATATCA ACCG CCATAGAAAGATATAGGTGTAC-3'	49
insD22 F	5' -GTACACCTATATCTTTCTATGGC GAT TGATATTCTGAAAGAAGAACTCT-3'	49
insD22 R	5' -AGAGTTCTTCTTTTCAGAATATCA AATC GCCATAGAAAGATATAGGTGTAC-3'	49
insF22 F	5' -GTACACCTATATCTTTCTATGGC TTT TGATATTCTGAAAGAAGAACTCT-3'	49
insF22 R	5' -AGAGTTCTTCTTTTCAGAATATCA AAAG CCATAGAAAGATATAGGTGTAC-3'	49
insF22-N23 F	5' -GTACACCTATATCTTTCTATGGC TTTAACT GATATTCTGAAAGAAGAACTCT-3'	52
insF22-N23 R	5' -AGAGTTCTTCTTTTCAGAATATCA GTTAAAG CCATAGAAAGATATAGGTGTAC-3'	52

Table S2

Main peptides detected in the culture supernatants of the strains *E. coli* MC4100 harbouring the WT or mutated plasmid pTUC202 (substitutions [G21Y], [G21R], [G21K], [G21D], [G21E], [G21N], insertion [insA5-6], deletions [Δ F10-V11] and [Δ G21]). For each variant, the relative intensity is scaled to the intensity of the expected MccJ25 or variant.

Peptides detected in the raw supernatants ^[a] , and corresponding annotations in Figure 2B-C	Monoisotopic mass (Da)	Charge state	Relative intensity ^[b]
MccJ25	2106.0	2+, 3+	100
{G1-V11 / G14-G21} (1)	1953.9	2+, 3+	4
{G1-V11 / G12-G21} (2)	2124.0	2+, 3+	6
[G21Y]	2212.1	2+, 3+	100
{G1-V11 / G14-Y21}	2060.0	2+, 3+	15
{G1-V11 / G12-Y21}	2230.1	2+, 3+	9
[G21R]	2205.1	2+, 3+	100
{G1-V11 / G14-R21}	2053.0	2+, 3+	9
{G1-V11 / G12-R21}	2223.1	2+, 3+	11
[G21K]	2177.2	2+, 3+	100
{G1-V11 / G14-K21}	2025.1	2+, 3+	6
{G1-V11 / G12-K21}	2195.2	2+, 3+, 4+	12
[G21D]	2164.0	2+, 3+	100
{G1-V11 / G14-D21}	2011.9	2+, 3+	2
{G1-V11 / G12-D21}	2182.0	2+, 3+	2
[G21E]	2178.1	2+, 3+	100
{G1-V11 / G14-E21}	2026.0	2+, 3+	2
{G1-V11 / G12-E21}	2196.1	2+, 3+	2
[G21N]	2163.1	2+, 3+	100
{G1-V11 / G14-N21}	2011.0	2+, 3+	5
{G1-V11 / G12-N21}	2181.1	2+, 3+	3
[insA5-6]	2177.1	2+, 3+	100
{P17-G22} (3)	682.3	1+, 2+	16
{T16-G22} (4)	783.4	1+, 2+	23
{G1-F11} (5)	1085.5	1+, 2+	43
{G1-V12} (6)	1184.6	2+	46
{G13-G22} (6)	1010.5	1+, 2+	23
{V12-G22} (7)	1109.6	1+, 2+	27
{G1-G15} (7)	1411.7	2+	43
[ΔF10-V11]	1859.9	2+, 3+	100
{G1-G10 / I11-G19} (8)	1877.9	2+, 3+	7
{I15-G19}	585.3	1+	1
{P14-G19} (3)	682.3	1+, 2+	8
[ΔG21]	2049.0	2+, 3+	100
{P16-Y20}	625.3	1+	91
{T15-Y20}	726.4	1+	22
{G1-F10}	1014.5	1+, 2+	354
{G1-V11}	1113.5	2+	36
{I13-Y20}	896.5	1+	16
{G12-Y20}	953.5	1+, 2+	15
{G1-G14}	1340.6	2+	21
{V11-Y20}	1052.5	1+, 2+	65

^[a] See nomenclature in the experimental section and supplementary Figure S1.

^[b] LC-MS quantification of multiprotonated species together with NH_4^+ - and K^+ -adducts.

Table S3¹H Sequential assignments of MccJ25 (*d*₆-DMSO, 298K, 400 MHz). n.d.: not determined.

Residue	H _N	H _α	H _β	H _γ	Others
Gly1	7.49	3.57/3.94	-	-	-
Gly2	8.66	3.84/3.96	-	-	-
Ala3	8.66	4.57	1.17	-	-
Gly4	7.79	3.29/3.85	-	-	-
His5	7.05	4.50	2.76/3.13	-	H _{δ2} : 7.30; H _{ε1} : 8.80
Val6	7.89	4.31	1.84	0.76/1.27	-
Pro7	-	4.34	1.47/1.63	1.83/2.04	H _δ : 3.77/3.83
Glu8	7.81	4.02	1.22/1.46	1.66/1.81	-
Tyr9	6.84	4.31	2.54/2.75	-	H _δ : 6.83; H _ε : 6.51; H _η : 9.13
Phe10	8.50	4.74	2.72/2.85	-	H _δ : 7.12; H _ε : n.d.; H _ζ : n.d.
Val11	8.12	4.32	2.04	0.77/0.82	-
Gly12	8.11	3.63/3.85	-	-	-
Ile13	8.00	4.16	1.73	H _{γ1} : 1.41 H _{γ2} : n.d.	H _{δ1} : 0.80
Gly14	8.23	3.37/4.04	-	-	-
Thr15	8.00	4.51	3.77	H _{γ2} : 1.09	-
Pro16	-	3.96	1.61	1.82/2.09	H _δ : 3.69/3.89
Ile17	8.44	4.54	1.46	H _{γ1} : 0.97 H _{γ2} : n.d.	H _{δ1} : 0.67
Ser18	6.78	4.36	3.54/3.64	5.49	-
Phe19	8.77	5.24	2.46	-	H _δ : 6.74; H _ε : 6.91; H _ζ : n.d.
Tyr20	9.44	4.90	2.93	-	H _δ : 6.84; H _ε : 6.60; H _η : 8.98
Gly21	8.88	3.62/3.85	-	-	-

Table S4¹H Sequential assignments of MccJ25 (*d*₃-MeOH, 298K, 600 MHz). n.d.: not determined.

Residue	H _N	H _α	H _β	H _γ	Others
Gly1	7.95	3.54/4.31	-	-	-
Gly2	8.99	3.88/4.22	-	-	-
Ala3	8.54	4.68	1.31	-	-
Gly4	7.77	3.52/4.06	-	-	-
His5	7.49	4.68	2.92/3.27	-	H _{δ2} : 7.33; H _{ε1} : 8.68
Val6	8.75	4.69	1.78	0.86/1.10	-
Pro7	-	4.21	1.70/1.80	1.98/2.25	H _δ : 3.82/4.14
Glu8	8.35	4.41	1.67	1.84/1.95	-
Tyr9	7.32	4.57	2.64/2.87	-	H _δ : 6.93; H _ε : 6.59; H _η : n.d.
Phe10	8.31	4.87	2.74/2.92	-	H _δ : n.d.; H _ε : n.d.; H _ζ : n.d.
Val11	8.28	4.30	2.14	0.93	-
Gly12	8.17	3.76/3.99	-	-	-
Ile13	8.33	4.17	1.93	H _{γ1} : 1.20/1.54 H _{γ2} : 0.93	H _{δ1} : 0.89
Gly14	8.45	3.62/4.06	-	-	-
Thr15	7.92	4.74	4.11	H _{γ2} : 1.21	-
Pro16	-	4.50	1.72/1.82	1.97/2.16	H _δ : 3.86/4.01
Ile17	7.99	4.44	1.87	H _{γ1} : 1.08/1.42 H _{γ2} : 0.90	H _{δ1} : 0.85
Ser18	7.36	4.39	3.86/4.08	-	-
Phe19	8.87	5.43	2.58	-	H _δ : 6.87; H _ε : 7.06; H _ζ : n.d.
Tyr20	9.51	4.89	2.99/3.30	-	H _δ : 6.96; H _ε : 6.70; H _η : n.d.
Gly21	8.59	3.83	-	-	-

Table S5¹H Sequential assignments of [insA5-6] (*d*₆-DMSO, 298K, 400 MHz). n.d.: not determined.

Residue	H _N	H _α	H _β	H _γ	Others
Gly1	8.04	3.60/3.90	-	-	-
Gly2	8.41	3.55/4.05	-	-	-
Ala3	8.22	4.32	1.20	-	-
Gly4	8.58	3.50/3.80	-	-	-
His5	7.27	4.45	2.79/2.99	-	H _{δ2} : 6.70; H _{ε1} : 7.66
Ala6	8.34	4.25	1.19	-	-
Val7	9.15	4.26	2.04	0.86	-
Pro8	-	4.21	1.62/1.78	1.93	H _δ : 3.52/3.83
Glu9	8.05	4.15	1.67/1.82	2.11/2.25	-
Tyr10	7.66	4.36	2.61/2.81	-	H _δ : 6.91; H _ε : 6.55; H _η : n.d.
Phe11	8.15	4.63	2.80/3.00	-	H _δ : 7.22; H _ε : 8.24; H _ζ : n.d.
Val12	7.96	4.18	1.97	0.85	-
Gly13	8.06	3.71/3.79	-	-	-
Ile14	7.84	4.19	1.70	H _{γ1} : 1.07/1.42 H _{γ2} : 0.83	H _{δ1} : 0.78
Gly15	8.22	3.70/3.78	-	-	-
Thr16	7.89	4.44	3.79	H _{γ2} : 1.08	-
Pro17	-	4.44	1.81	1.98	H _δ : 3.63/3.69
Ile18	8.00	4.13	1.75	H _{γ1} : 1.09/1.39 H _{γ2} : 0.88	H _{δ1} : 0.78
Ser19	7.95	4.36	3.52/3.72	-	-
Phe20	8.20	4.33	2.70/2.87	-	H _δ : n.d.; H _ε : n.d.; H _ζ : n.d.
Tyr21	8.04	4.38	2.59/2.99	-	H _δ : 7.00; H _ε : 6.65; H _η : n.d.
Gly22	7.73	3.53/3.76	-	-	-

Table S6¹H Sequential assignments of [G21D] (*d*₃-MeOH, 298K, 600 MHz). n.d.: not determined.

Residue	H _N	H _α	H _β	H _γ	Others
Gly1	7.82	3.52/4.23	-	-	-
Gly2	9.02	3.82/4.20	-	-	-
Ala3	8.46	4.62	1.27	-	-
Gly4	7.75	3.41/3.94	-	-	-
His5	7.35	4.68	3.02/3.22	-	H _{δ2} : n.d.; H _{ε1} : n.d.
Val6	8.59	4.65	1.62	0.82/1.05	-
Pro7	-	4.18	1.65/1.76	1.94/2.21	H _δ : 3.78/4.11
Glu8	8.31	4.33	1.59	1.72/1.86	-
Tyr9	7.25	4.52	2.60/2.83	-	H _δ : 6.89; H _ε : 6.55; H _η : n.d.
Phe10	8.27	n.d.	2.72/2.90	-	H _δ : 7.03; H _ε : 7.12; H _ζ : n.d.
Val11	8.22	4.25	2.09	0.89	-
Gly12	8.12	3.72/3.96	-	-	-
Ile13	8.28	4.13	1.89	H _{γ1} : 1.50 H _{γ2} : 1.16	H _{δ1} : 0.89
Gly14	8.41	3.59/4.01	-	-	-
Thr15	7.88	4.69	4.06	H _{γ2} : 1.17	-
Pro16	-	4.45	1.68/1.81	1.93/2.12	H _δ : 3.82/3.97
Ile17	7.94	4.39	1.82	H _{γ1} : 1.38 H _{γ2} : 1.04	H _{δ1} : 0.81
Ser18	7.29	4.33	3.81/4.00	-	-
Phe19	8.87	5.37	2.50/2.59	-	H _δ : 6.83; H _ε : 7.02; H _ζ : n.d.
Tyr20	9.44	4.83	2.92/3.07	-	H _δ : 6.98; H _ε : 6.66; H _η : n.d.
Asp21	8.85	4.71	2.60/2.96	-	-

Table S7¹H Sequential assignments of [G21R] (*d*₃-MeOH, 298K, 600 MHz). n.d.: not determined.

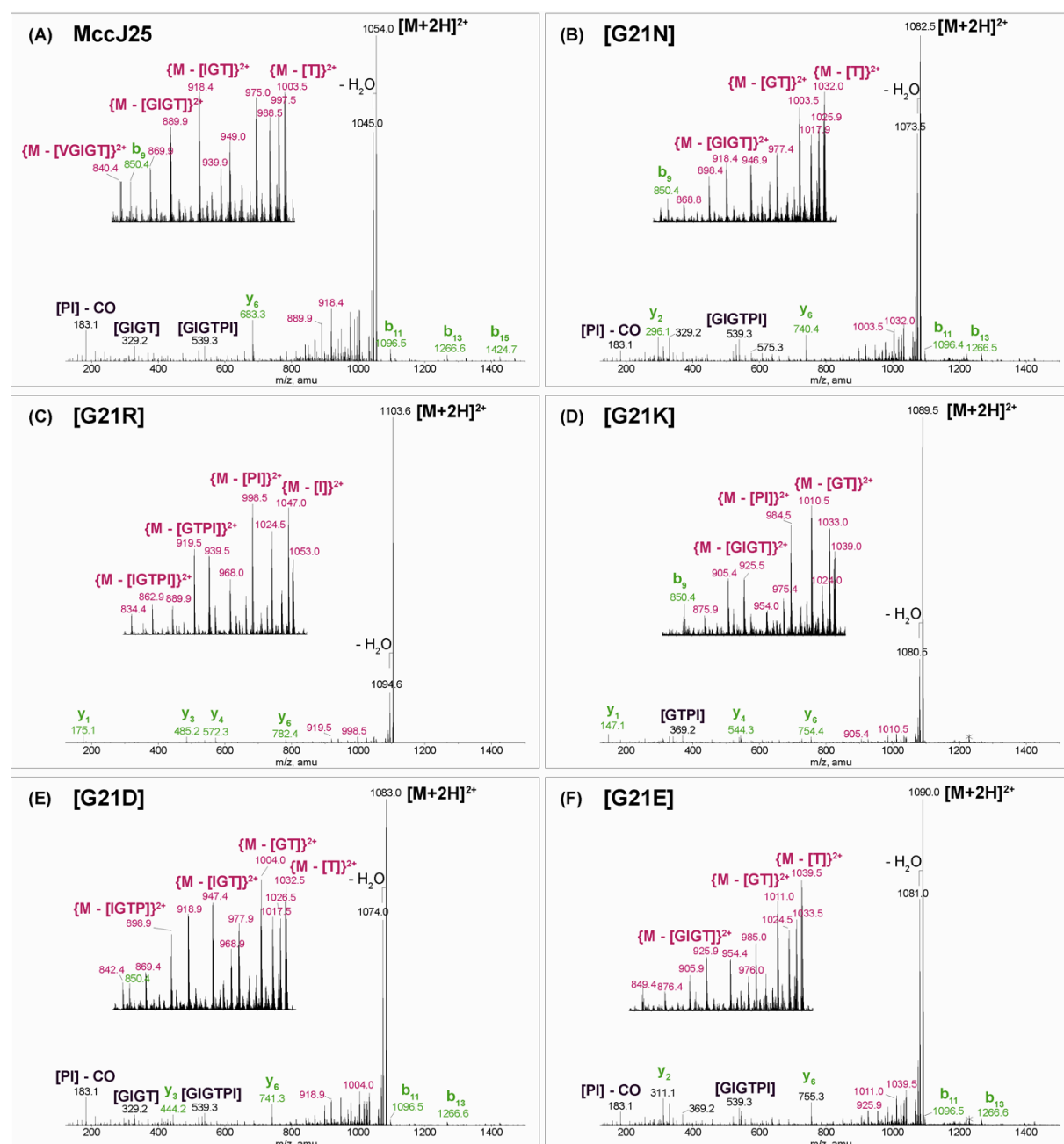
Residue	H _N	H _α	H _β	H _γ	Others
Gly1	7.79	3.52/4.29	-	-	-
Gly2	9.11	3.83/4.25	-	-	-
Ala3	8.43	4.65	1.33	-	-
Gly4	7.70	3.49/4.14	-	-	-
His5	7.86	4.70	3.05/3.26	-	H _{δ2} : 7.32; H _{ε1} : 8.73
Val6	8.49	4.75	2.00	0.97/1.15	-
Pro7	-	4.20	1.70/1.80	1.98/2.26	H _δ : 3.85/4.24
Glu8	8.33	4.35	1.35	1.53/1.70	-
Tyr9	7.13	4.59	2.62/2.87	-	H _δ : 6.94; H _ε : 6.59; H _η : n.d.
Phe10	8.37	4.91	2.75/2.94	-	H _δ : 7.06; H _ε : 7.16; H _ζ : n.d.
Val11	8.28	4.35	2.14	0.93	-
Gly12	8.23	3.75/4.00	-	-	-
Ile13	8.36	4.16	1.94	H _{γ1} : 1.19/1.55 H _{γ2} : 0.93	H _{δ1} : 0.93
Gly14	8.42	3.61/4.06	-	-	-
Thr15	7.98	4.74	4.12	H _{γ2} : 1.21	-
Pro16	-	4.50	1.71/1.83	1.98/2.19	H _δ : 3.86/4.07
Ile17	7.99	4.44	1.85	H _{γ1} : 1.08/1.41 H _{γ2} : n.d.	H _{δ1} : 0.85
Ser18	7.29	4.33	3.82/3.99	-	-
Phe19	8.98	5.24	2.57/2.66	-	H _δ : 6.90; H _ε : 7.08; H _ζ : n.d.
Tyr20	9.42	4.66	2.90/3.09	-	H _δ : 7.09; H _ε : 6.79; H _η : n.d.
Arg21	8.55	4.30	1.78/1.95	1.61	H _δ : 3.16; H _ε : 7.34

MS/MS spectra of the $[M+2H]^{2+}$ species of MccJ25 + 18 Da (m/z 1063), assigned to {G1-V11 / G12-G21} (A) and MccJ25 – 152 Da (m/z 978), assigned to {G1-V11 / G14-G21}. The excitation voltage is 40 V. See nomenclature of the product ions in the experimental section. The product ions with + 18 Da increment, used to localize the hydrolysis site, are labelled in red. Inserts show the identified species with two typical product ions.



Figure S2

MS/MS spectra of the $[M+2H]^{2+}$ species of MccJ25 and variants, carried out using a 40 V excitation voltage. (A) MccJ25 (m/z 1054.0), variants (B) [G21N] (m/z 1082.5), (C) [G21R] (m/z 1103.6), (D) [G21K] (m/z 1089.5), (E) [G21D] (m/z 1083.0), (F) [G21E] (m/z 1090.0), (G) [Δ G12-G14] (m/z 940.4), (H) [Δ F10-V11] (m/z 930.9), (I) [insG22] (m/z 1082.5), (J) [insD22] (m/z 1111.5), (K) [Y20I] (m/z 1029.0), (L) [Δ G21] (m/z 1025.5). The y - and b -type product ions corresponding to cleavages within the tail are shown in green, while the two-peptide product ions are shown in magenta (see nomenclature of the product ions in the experimental section).



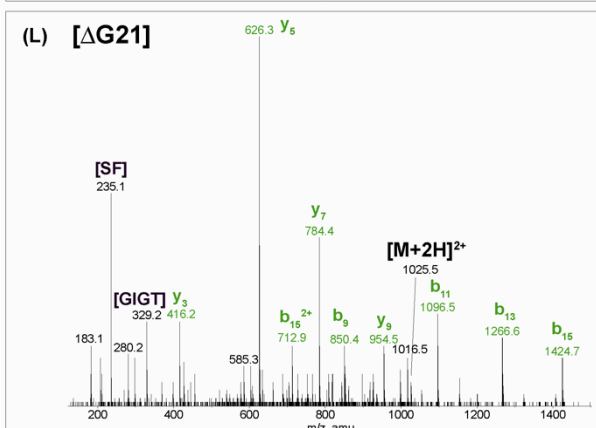
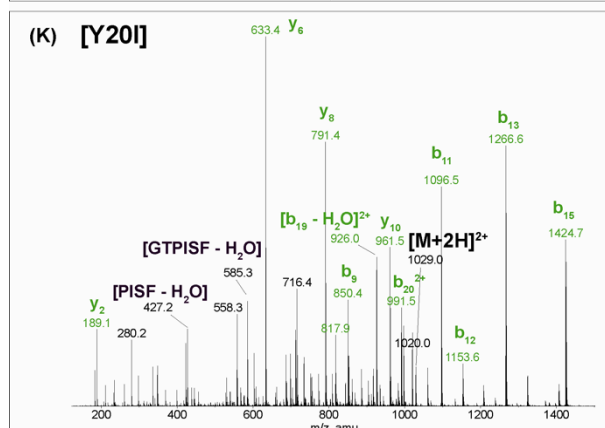
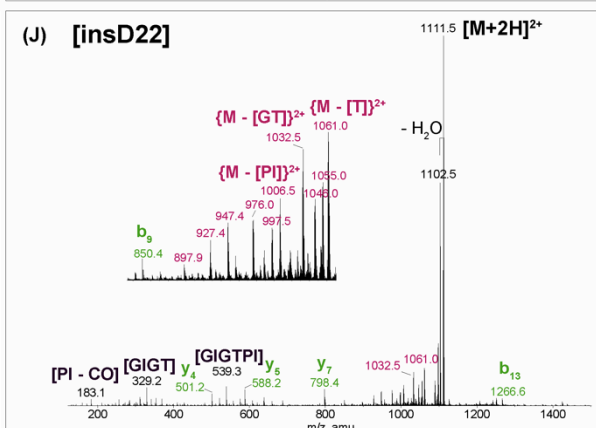
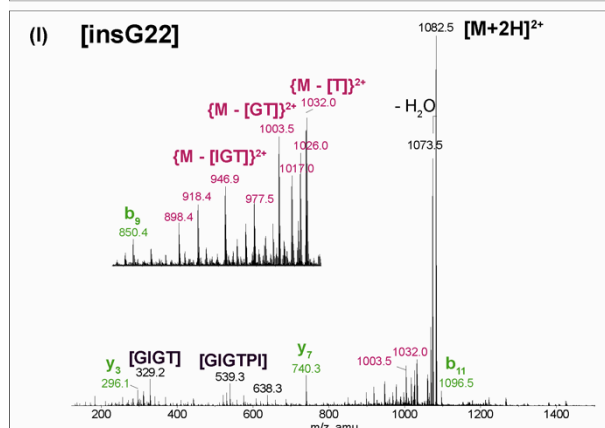
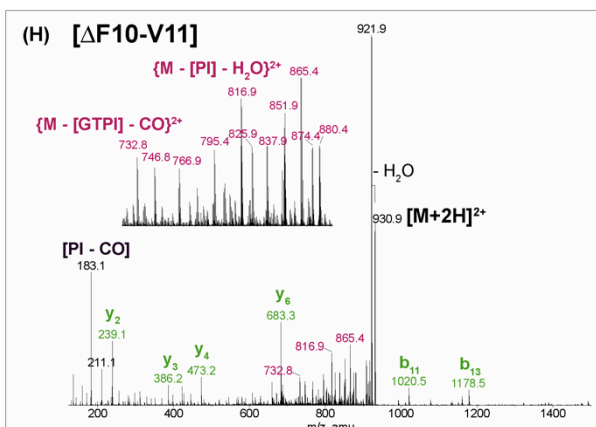
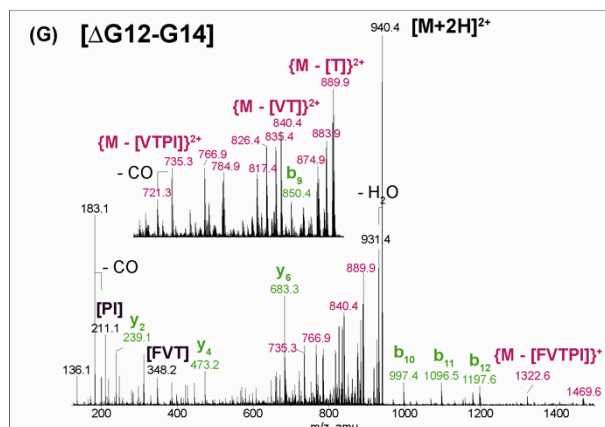


Figure S3

MS/MS spectrum of the $[M+3H]^{3+}$ species of MccJ25 – 81 Da (m/z 676), assigned to {G1-F10 / G12-G21}. See nomenclature of the product ions in the experimental section. Immonium ions are noted with one-letter amino acid letters. The product ions with + 18 Da increment, used to localize the hydrolysis site, are labelled in red. Inserts show the identified species with two typical product ions.

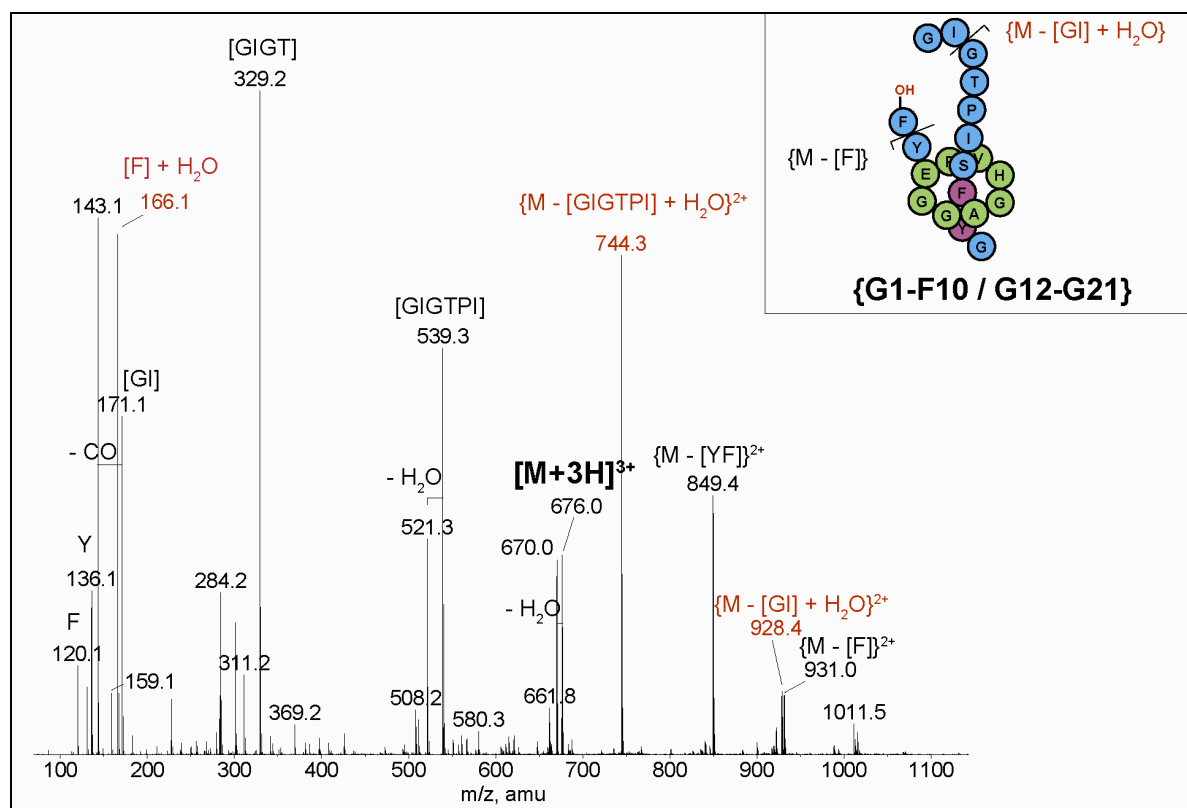


Figure S4

2D ^1H - ^1H NOESY spectra (d_6 -DMSO, 298 K, 400 MHz, $\tau_m = 300$ ms) of MccJ25 (A) and [insA5-6] (B). The intra-residue, sequential and long-range NOE correlations are shown in black, green and red, respectively. The sequential and long-range NOE correlations are denoted with amino acid numbers, written in the order ω_2 - ω_1 .

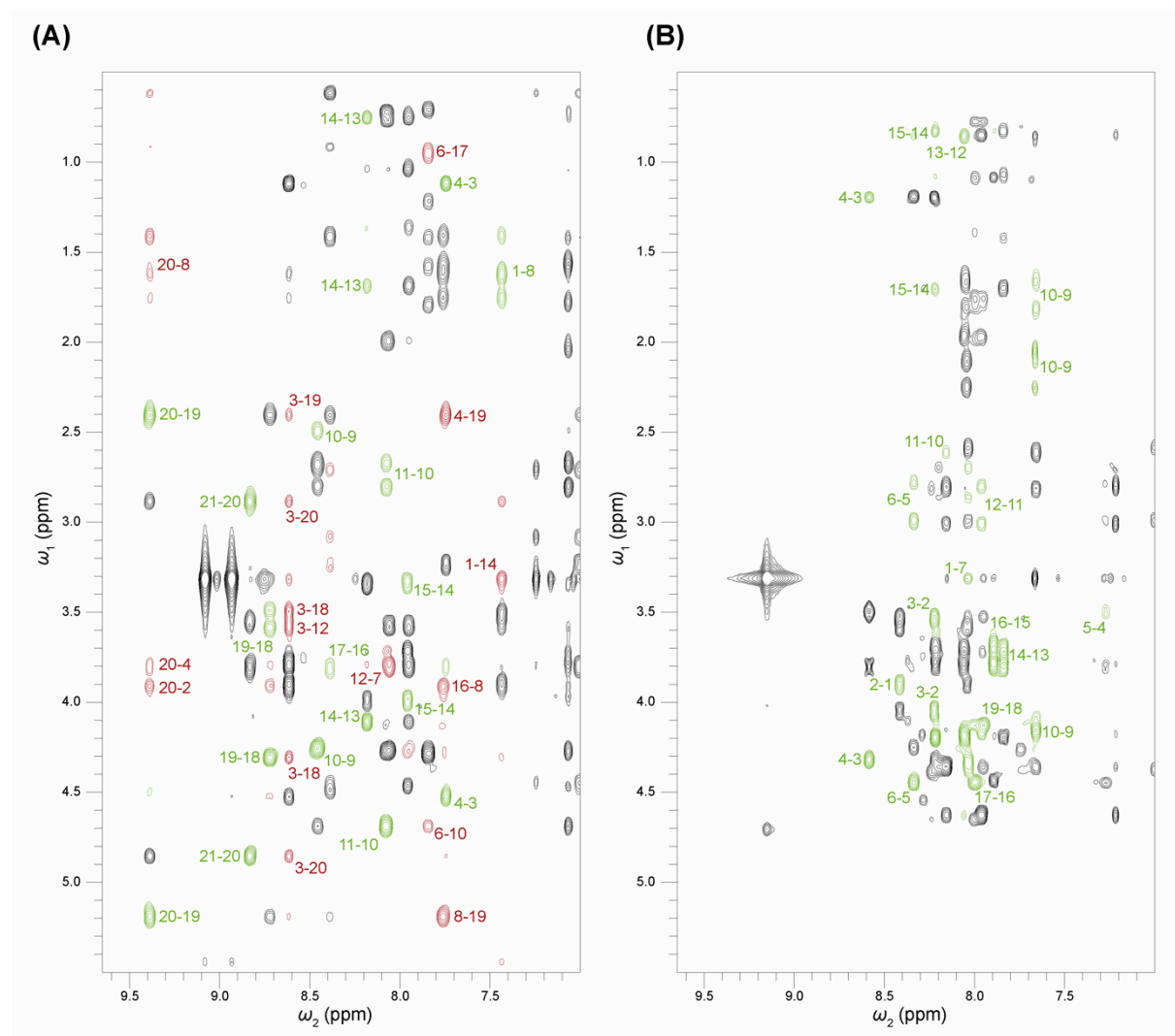


Figure S5

2D ^1H - ^1H NOESY spectra (CD_3OH , 298 K, 600 MHz, $\tau_m = 200$ ms) of MccJ25 (A), and variants [G21D] (B) and [G21R]. The intra-residue, sequential and long-range NOE correlations are shown in black, green and red, respectively. The sequential and long-range NOE correlations are denoted with amino acid numbers, written in the order ω_2 - ω_1 .

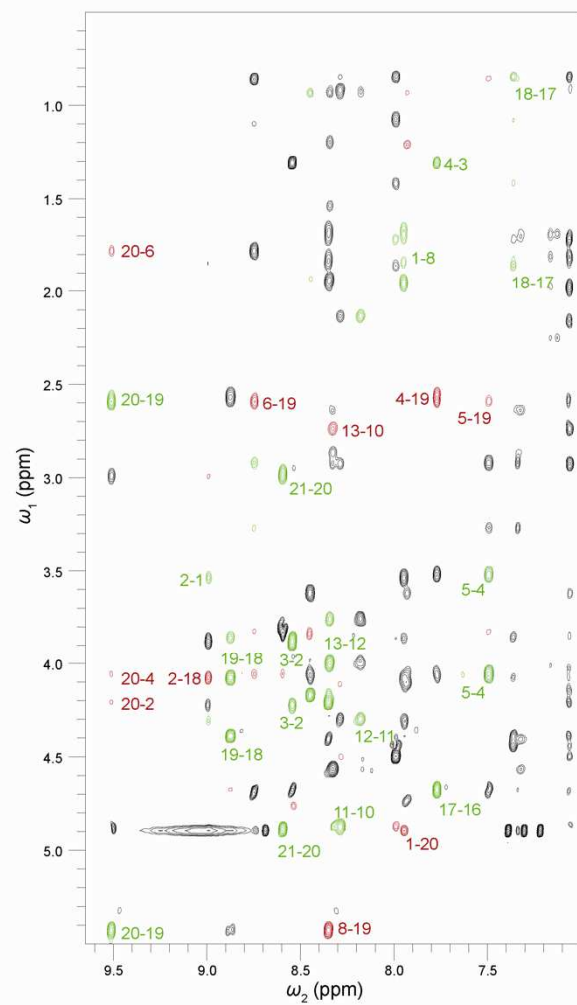
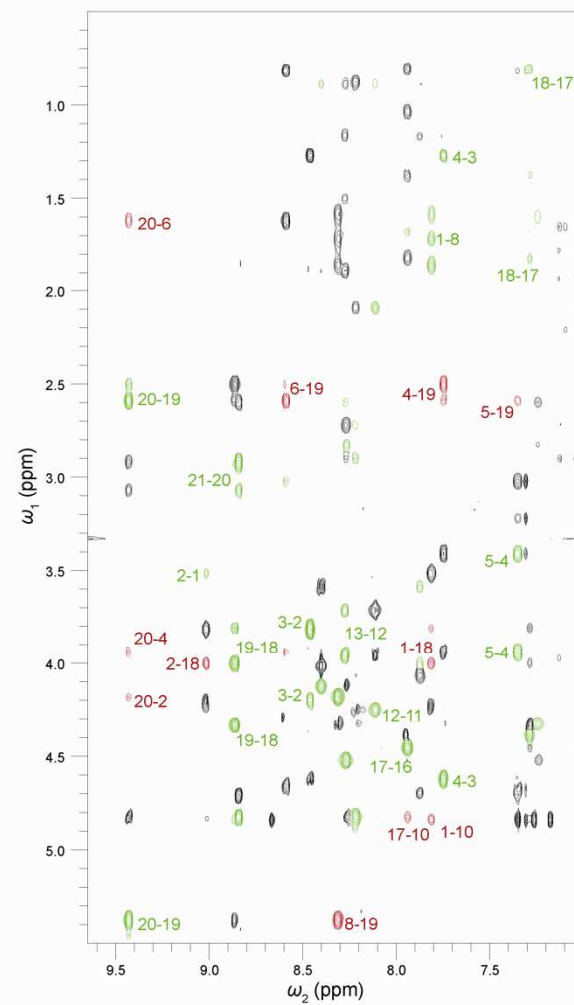
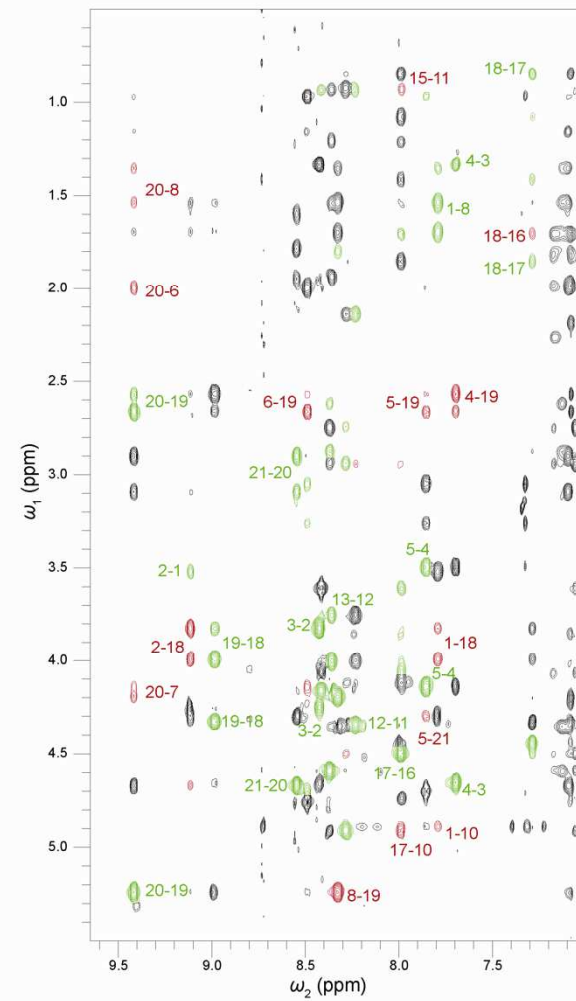
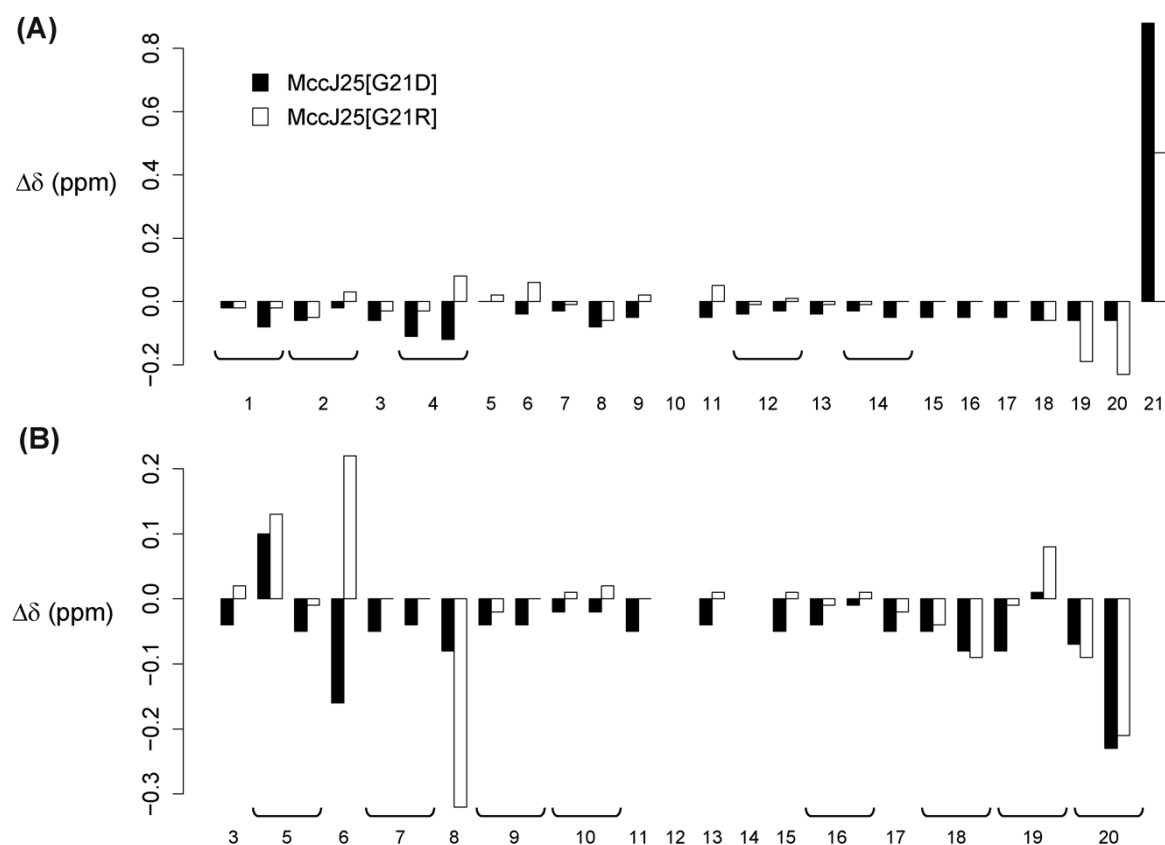
(A)**(B)****(C)**

Figure S6

Chemical shift differences between the H α (A) and H β (B) protons of the variants [G21D] and [G21R] and MccJ25 (CD₃OH, 298 K, 600 MHz). For CH₂ groups (e.g.: H α protons of glycine and H β protons of His, Pro, Tyr, Phe, Ser residues), the chemical shift differences are reported for each proton if the two vicinal protons are inequivalent.



Chapitre III : Isolement, purification et caractérisation structurale d'un nouveau peptide lasso de type I

Introduction

L'organisation conservée des systèmes génétiques de biosynthèse des peptides lasso et le nombre toujours grandissant de génomes procaryotes séquencés, a permis de développer des méthodes de recherche de nouveaux peptides lasso. L'exploration de génomes est un de ces nouveaux outils permettant de détecter la présence de systèmes génétiques similaires à ceux des peptides lasso chez des espèces bactériennes qui n'étaient pas connues pour en produire.

La capistruine, peptide lasso de type II produite par *Burkholderia thailandensis* E264, est le premier peptide lasso découvert par exploration de génomes¹⁵⁴. L'astexine-1, récemment isolée de *Asticacaulis excentricus*, a aussi été caractérisée par un nouvel algorithme de « genome mining »¹³⁵. Cette technique a prédit d'autres peptides lasso qui ont été détectés par MS¹⁵⁵ mais pas isolés.

L'objet de ce chapitre est l'étude d'un nouveau peptide lasso de type I, antimicrobien, isolé de *Streptomyces sviceus*, la **svicéucine**, depuis sa découverte par exploration de génome à sa caractérisation structurale par modélisation moléculaire sous contraintes RMN.

I. Isolement et purification de la svicéucine

I.1. Exploration de génome

L'exploration des génomes bactériens a permis d'identifier sur le chromosome de l'espèce *Streptomyces sviceus* un cluster de gène d'un nouveau peptide lasso putatif (Figure 53). Ce cluster est constitué de huit gènes codant un précurseur (*svicA*), une protéase (*svicB*), une asparagine-synthétase B (*svicC*) et un système d'export (*svicD1*, *svicD2*, *svicD3* et *svicD4*). Le gène *svicB1* code une

■ transporteur ■ précurseur
 ■ protéase ■ Asp synthétase B

1 kb
 6,5 kb

1 36 55
 LISTTNGQGTTPMTSTDELYEAPELIEIGDYAELTR—CVWGGDCTDFLGCGTAWICV
 leader core-peptide

SvicB
 SvicC

S S
 CVWGGDCTDFLGCGTAWICV
 S S

Le genre *Streptomyces* est connu pour être producteur de peptides lasso puisque les siamycines I et II (*Streptomyces* sp. M-271), l'anantine (*Streptomyces coerulescens*), le peptide BI-32169 (*Streptomyces* sp. (DSM 14996)), le peptide RP-71955 (*Streptomyces* sp. SP9440) et le peptide RES-701-1 (*Streptomyces* sp. RE-701) sont tous produits par des bactéries de ce genre (Tableau 7). Par ailleurs, la séquence du précurseur SvicA correspondant au peptide mature est similaire à celle des siamycines et du peptide RP-71955. Les peptides lasso de type I déjà décrits partagent 90 à 95 % d'identité de séquence, et la séquence de la svicéucine est identique à 45 % à celle de ces peptides.

134

examinée lors de l'analyse structurale du peptide.

I.2. Production hétérologue de la svicéucine et purification

L'analyse du surnageant d'une culture liquide de *Streptomyces sviceus* par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS) a montré que dans nos conditions de culture, le peptide n'était pas produit en assez grande quantité pour pouvoir en faire une analyse structurale complète. Nous avons donc choisi d'exprimer de manière hétérologue ce peptide chez *Streptomyces coelicolor*. Après validation de la bonne production du peptide par LC-MS, nous l'avons purifié par pré-purification sur cartouche de phase inverse suivie d'une étape de purification par HPLC en phase inverse.

Cette méthode de production nous a permis d'obtenir environ 9 mg.L⁻¹ de culture, soit une quantité suffisante pour envisager une étude structurale du peptide par MS et RMN.

I.3. Caractérisation de la svicéucine par MS

L'analyse par MS en mode ESI a identifié des ions monoisotopiques $[M+3H]^+^{3+}$ et $[M+2H]^+^{2+}$ respectivement de m/z 695,3 et m/z 1042,4 correspondant à la masse attendue pour un peptide avec le cycle macrolactame et les deux ponts disulfure.

La MS/MS sur la svicéucine a révélé des m/z correspondant à des fragments caractéristiques d'une structure lasso maintenue par des ponts disulfure. Outre les ions b et y correspondant à la fragmentation de la queue C-terminale, nous obtenons des m/z de fragments peptidiques associés par les ponts disulfure (Figure 54). L'ion de m/z 883,8 (2⁺) correspondrait ainsi au m/z de la svicéucine fragmentée au niveau de sa boucle et dont la queue C-terminale ne serait plus reliée au cycle que par l'intermédiaire des deux ponts disulfure. De plus, l'ion de m/z 913,8 (2⁺) correspondrait au rapport m/z de la svicéucine fragmentée entre les deux ponts disulfure. Les trois résidus C-terminaux seraient maintenus liés au cycle par le pont disulfure Cys7/Cys19.

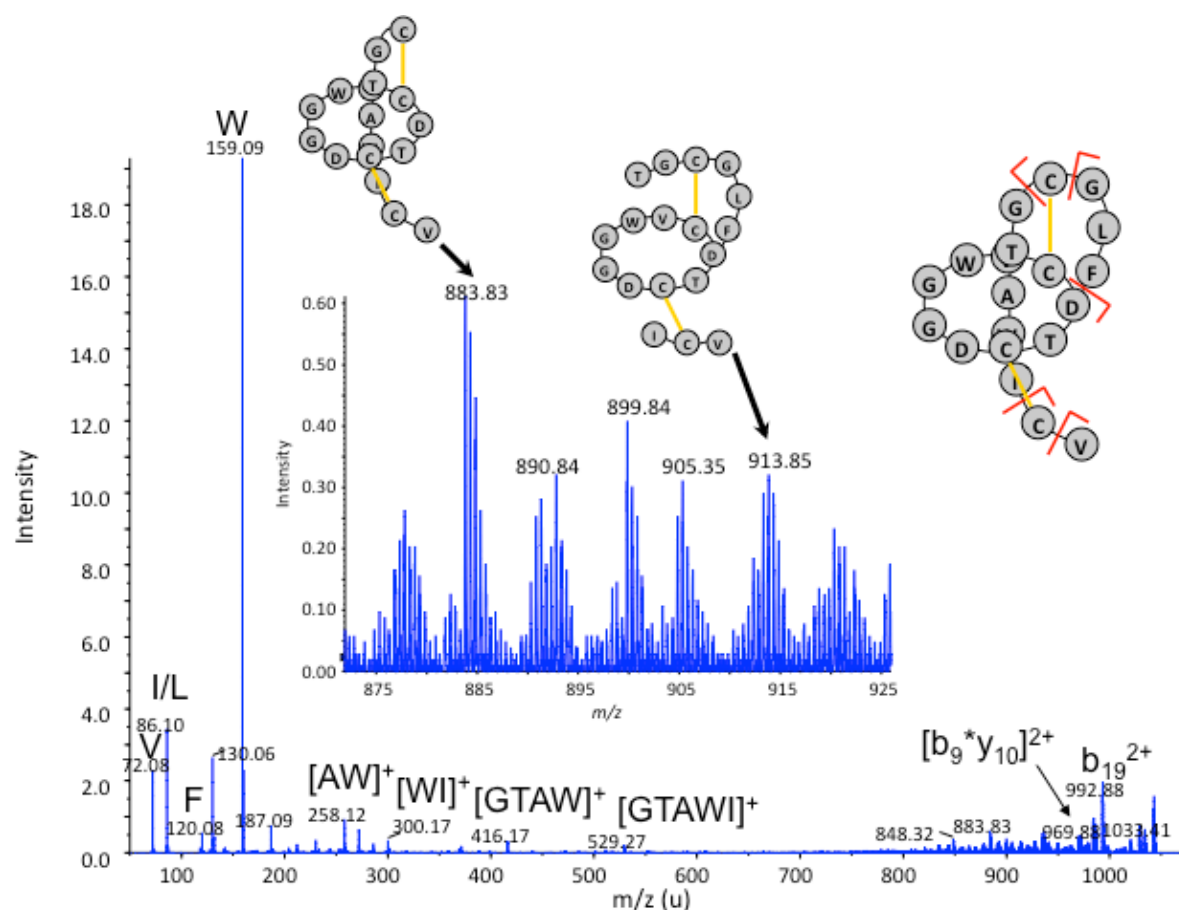


Figure 54 : Spectre de masse en mode tandem de la svicéucine. Les fragmentations dans la queue C-terminale de la svicéucine sont représentées par des barres rouges.

II. Activité antimicrobienne de la svicéucine

L'activité antimicrobienne de la svicéucine a été testée sur plusieurs souches bactériennes à Gram positif et négatif et des levures. La svicéucine est active contre des souches à Gram positif (Tableau 15) avec des CMI de l'ordre du μM mais est inactive sur les bactéries à Gram négatif et les levures testées.

Tableau 15 : Mesure de l'activité antimicrobienne (CMI) de la svcéucine. - : inactif.

Bactéries à Gram négatif	CMI (μM)
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Salmonella enterica</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-
<i>Erwinia carotovora</i>	-
<i>Burkholderia thailandensis</i>	-
<i>Vibrio harveyi</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
Bactéries à Gram positif	
<i>Bacillus megaterium</i>	1,25
<i>Micrococcus luteus</i>	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,5
<i>Listeria ivanovii</i>	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	>10
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1,25
<i>Lactobacillus sakei</i>	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	10
<i>Streptomyces</i> sp. 523	2,5
<i>Streptomyces</i> sp. 510	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-
Levures	
<i>Candida albicans</i>	-
<i>Candida tropicalis</i>	-

III. Caractérisation structurale de la svcéucine par modélisation moléculaire sous contraintes RMN

III.1. Enregistrement et analyse des spectres RMN 2D

III.1.1. Déplacements chimiques et corrélations des protons

La svcéucine a été dissoute dans *d*3-MeOH à une concentration de 2,4 mM afin de procéder à une étude structurale complète par RMN (voir Matériel et méthodes, IV.4.4.3).

La région des déplacements chimiques des protons amides du spectre 1D ^1H est comprise entre 6,5 et 9,5 ppm et les systèmes de spin sont bien séparés, ce qui indique que le peptide en solution présente une structure tridimensionnelle ordonnée.

L'attribution séquentielle ^1H a été obtenue selon la méthode de Wüthrich²⁵⁴, d'après les spectres TOCSY et NOESY.

Le spectre TOCSY (80 ms, Figure 55, A) enregistré à 298 K a principalement servi à l'identification des différents systèmes de spins de la svicéucine. Par ailleurs, les taches de corrélation entre les protons des systèmes de spin sont bien définies sauf pour deux acides aminés qu'il a été difficile de caractériser (Leu11 et Cys13) à partir de l'étude de cette seule région du spectre. Afin de déterminer leurs systèmes de spins, nous avons étudié les spectres TOCSY à différentes températures ainsi que les corrélations NOE dans la région des corrélations $^1\text{H}_\text{N}$ - $^1\text{H}_\alpha$.

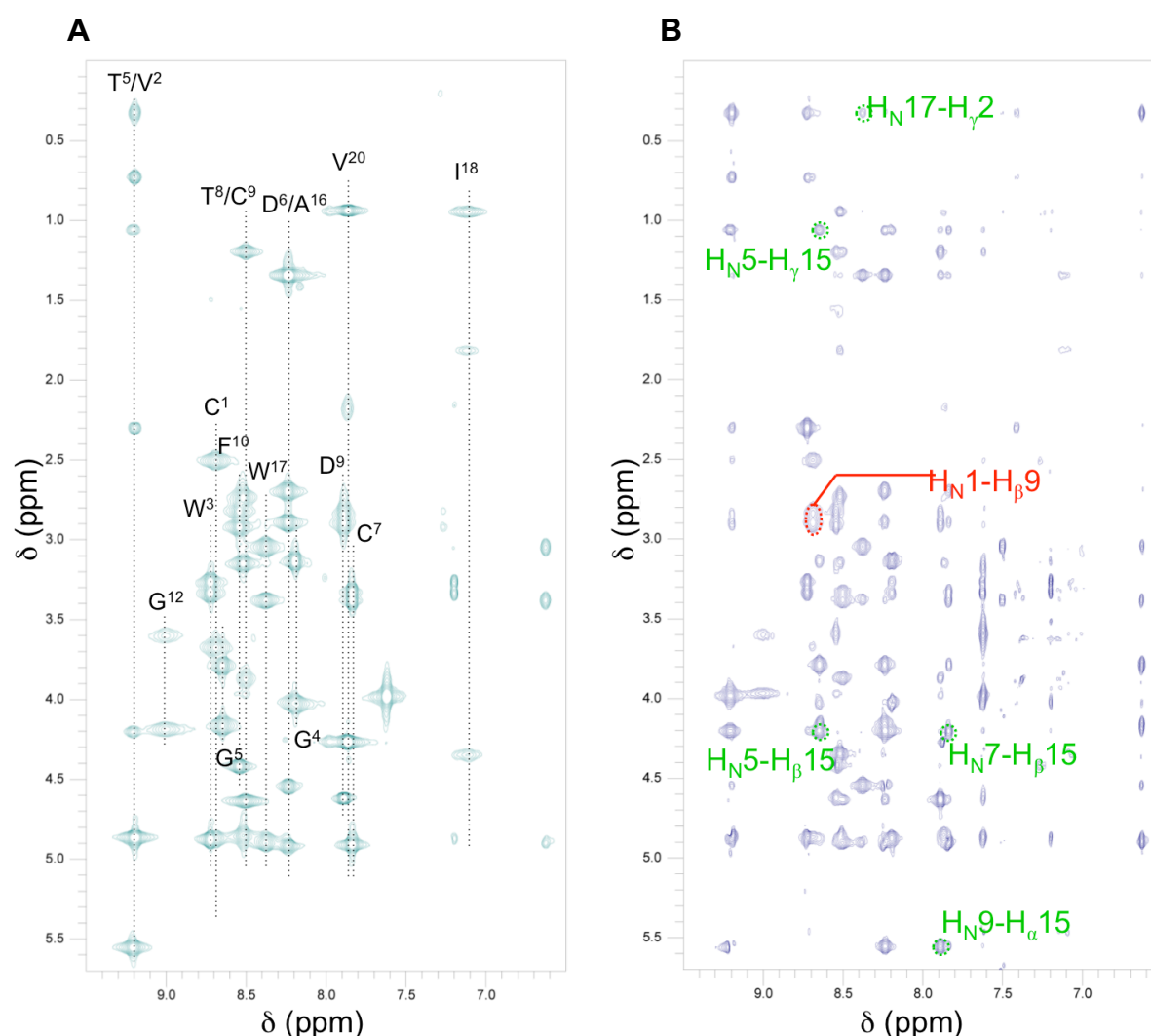


Figure 55 : Spectres A) TOCSY (80 ms) et B) NOESY (150 ms) de la svicéucine (2,4 mM, d_3 -MeOH, 600 MHz, 298 K, $\omega_1 = 6,5 - 9,5$ ppm et $\omega_2 = 0 - 5,7$ ppm). Les systèmes de spins sont représentés sur le TOCSY. Sur le spectre NOESY, la corrélation spécifique de la liaison lactame est entourée en rouge. Les principales corrélations témoignant d'une proximité spatiale entre résidus du cycle et de la partie C-terminale sont marquées en vert.

Le spectre NOESY (150 ms, Figure 55B) a permis de déterminer l'ordre des acides aminés dans la séquence et de mettre en évidence des taches de corrélation caractéristiques d'une structure lasso. Le Tableau 16 rassemble l'attribution séquentielle des protons de la svicéucine, déterminée par étude simultanée des spectres TOCSY et NOESY.

Tableau 16 : Déplacements chimiques des protons de la svicéucine en ppm (298 K, *d*3-MeOH, 600 MHz).

Résidu	H _N	H _α	H _β	H _γ	Autres
Cys1	8,69	4,89	2,50/3,67		-
Val2	9,20	4,86	2,29	0,32/0,72	-
Trp3	8,72	4,87	3,26/3,33	-	H _{δ1} : 7,20 ; H _{ε1} : 10,46 ; H _{ε3} : 7,63 ; H _{ζ2} : 7,38 ; H _{ζ3} : 7,08 ; H _{η2} : 7,31
Gly4	8,19	3,13/4,02	-	-	-
Gly5	8,65	3,78/4,16	-	-	-
Asp6	8,24	4,91	2,69/2,89	-	-
Cys7	7,84	4,90	3,32/3,37		-
Thr8	8,50	4,63	3,86	1,19	-
Asp9	7,89	4,61	2,83/2,89	-	-
Phe10	8,54	4,41	2,82/2,91	-	H _δ : 7,27 ; H _ε : 7,23 ; H _ζ : 7,18 ;
Leu11	8,53	3,96	1,55	1,58	H _δ : 0,92/0,96
Gly12	9,00	3,60/4,18	-	-	-
Cys13	8,63	4,60	3,18/3,59		-
Gly14	7,62	3,97	-	-	-
Thr15	9,21	5,55	4,20	1,05	-
Ala16	8,23	4,53	1,33	-	-
Trp17	8,37	4,89	3,04/3,37	-	H _{δ1} : 6,63 ; H _{ε1} : 10,24 ; H _{ε3} : 7,50 ; H _{ζ2} : 7,41 ; H _{ζ3} : 7,02 ; H _{η2} : 7,01
Ile18	7,11	4,34	1,81	H _{γ1} : 1,20/1,59 H _{γ2} : 0,95	H _δ : 0,95
Cys19	8,52	4,85	2,73/3,14		-
Val20	7,86	4,26	2,17	0,92/0,93	-

Nous avons observé des taches de corrélation entre le proton H_N1 et les protons H_β9, témoignant d'une proximité spatiale entre les résidus Cys1 et Asp9 caractéristique de la liaison lactame formant un cycle à neuf résidus. Outre ce premier indice, nous avons observé des taches de corrélation entre résidus très éloignés dans la séquence. Par exemple, les protons de Thr15 corrélaient avec des résidus du cycle macrolactame : H_α15 corrélaient avec H_N9, H_β15 corrélaient avec H_N5 et H_N7 et H_γ15 corrélaient avec H_N5 (voir le spectre NOESY sur la Figure 55). Ces témoins d'un rapprochement spatial entre protons de résidus qui ne sont pas consécutifs dans la séquence laissent supposer que le peptide est hautement structuré malgré sa courte séquence en acides aminés.

Par ailleurs, les peptides lasso présentent généralement une tache de corrélation dipole-dipole de type H_α - H_α impliquant un résidu du cycle et un résidu de la queue C-terminale, spécifique d'un petit feuillet β antiparallèle. Nous avons pu identifier une telle tache chez la svicéucine entre $H_{\alpha 8}$ et $H_{\alpha 15}$ (Figure 56), montrant de façon claire la présence d'un feuillet β antiparallèle impliquant ces deux résidus.

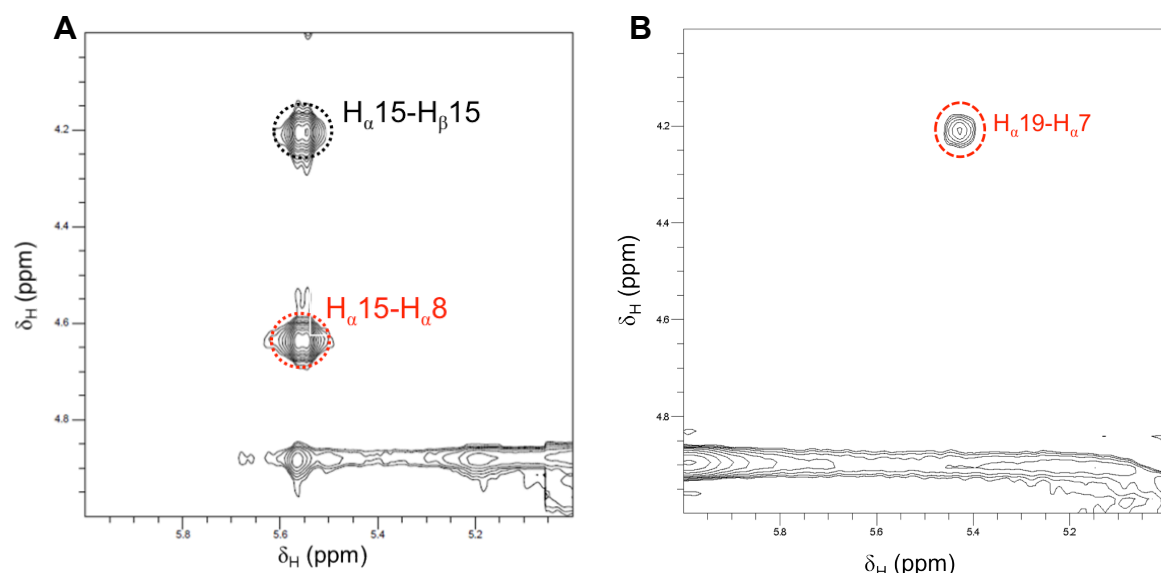


Figure 56 : Comparaison des régions des corrélations H_α - H_α ($\omega_1 = 5 - 6$ ppm et $\omega_2 = 4 - 5$ ppm) pour A) la svicéucine et B) MccJ25, montrant la tache de corrélation spécifique d'un feuillet β antiparallèle.

Les spectres HSQC $^1H/^{15}N$ et $^1H/^{13}C$ enregistrés dans d_3 -MeOH () ont permis de déterminer les déplacements chimiques des hétéroatomes de la svicéucine, qui sont rassemblés dans le Tableau 17.

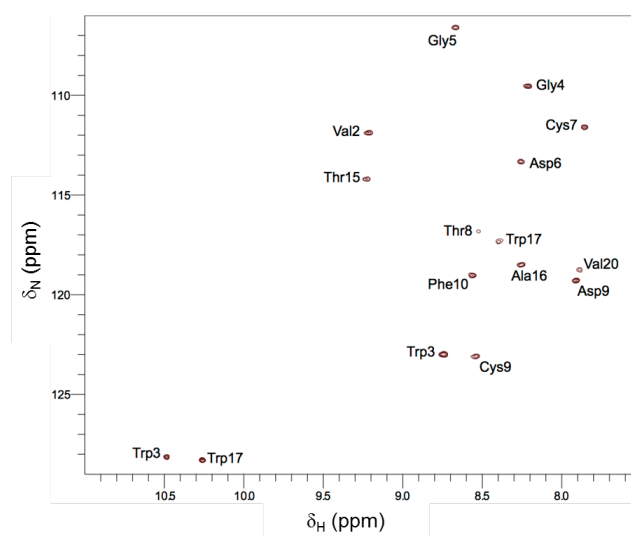


Figure 57 : Spectre HSQC $^1H/^{15}N$ de la svicéucine dans la région $\omega_1 = 7,5 - 11$ ppm et $\omega_2 = 105 - 130$ ppm (d_3 -MeOH, 600 MHz, 298 K).

L'étude de ces spectres nous a notamment permis de vérifier l'état d'oxydation des cystéines du peptide. En effet, le déplacement chimique des C_β des cystéines impliquées dans des ponts disulfure est distribué autour de la valeur moyenne de 42,1 ppm, alors que le déplacement chimique des C_β des cystéines réduites est distribué autour de 27,3 ppm. Les cystéines de la svicéucine présentent des déplacements chimiques de C_β typiques de ceux de cystéines engagées dans des ponts disulfure ($C_{\beta-Cys13} = 44,52$ ppm , $C_{\beta-Cys7} = 43,90$ ppm, $C_{\beta-Cys19} = 42,43$ ppm)²⁶⁵.

Tableau 17 : Déplacements chimiques des ^{13}C et des ^{15}N de la svicéucine en ppm (298 K, d_3 -MeOH, 600 MHz). n.d. : non-déterminé.

Résidu	C_α	C_β	C_γ	Autres	N	Autres
Cys1	n.d.	44,52	-	-	-	-
Val2	58,43	32,20	16,66/19,56	-	111,87	-
Trp3	55,78	29,57	-	C_δ : 124,37 ; C_ϵ : 118,82 ; $C_{\zeta 2}$: 112,16 ; $C_{\zeta 3}$: 119,58 ; C_η : 122,27	123,00	N_ϵ : 128,14
Gly4	44,65	-	-	-	109,54	-
Gly5	42,12	-	-	-	106,60	-
Asp6	51,55	37,57	-	-	113,32	-
Cys7	53,21	43,90	-	-	111,59	-
Thr8	61,71	68,44	20,24	-	116,83	-
Asp9	52,97	35,75	-	-	119,28	-
Phe10	55,78	40,20	-	C_δ : 130,47 ; C_ϵ : 128,93 ; C_ζ : 127,44	119,04	-
Leu11	55,49	40,43	25,31	C_δ : 22,42/22,51	-	-
Gly12	43,74	-	-	-	-	-
Cys13	n.d.	n.d.	-	-	-	-
Gly14	44,87	-	-	-	-	-
Thr15	58,66	71,88	19,84	-	114,21	-
Ala16	48,50	20,99	-	-	118,50	-
Trp17	55,2	28,12	-	C_δ : 121,53 ; C_ϵ : 118,37 ; $C_{\zeta 2}$: 112,27 ; $C_{\zeta 3}$: 119,41 ; C_η : 122,27	117,34	N_ϵ : 128,30
Ile18	58,55	38,02	$C_{\gamma 1}$: 25,65 ; $C_{\gamma 2}$: 15,40	C_δ : 10,8	-	-
Cys19	52,59	42,43	-	-	123,08	-
Val20	59,81	31,89	17,88/19,43	-	118,76	-

III.1.2. Détermination de l'appariement des ponts disulfure

D'après la similarité de structure primaire des peptides lasso de type I, nous avons formulé l'hypothèse que les ponts disulfure de la svicéucine étaient appariés de la même manière soit Cys1/Cys13 et Cys7/Cys19. La mise en évidence d'une

tache de corrélation NOE entre les protons $H_{\beta}7$ et $H_{\beta}19$ dans H_2O à 950 MHz a permis confirmer cet appariement entre les cystéines (Figure 58). Il est à noter que cette tache de corrélation critique pour la caractérisation structurale complète de la svicéucine n'a pu être observée ni dans le solvant utilisé pour l'étude, d_3 -MeOH, ni dans d_6 -DMSO, mais seulement dans H_2O .

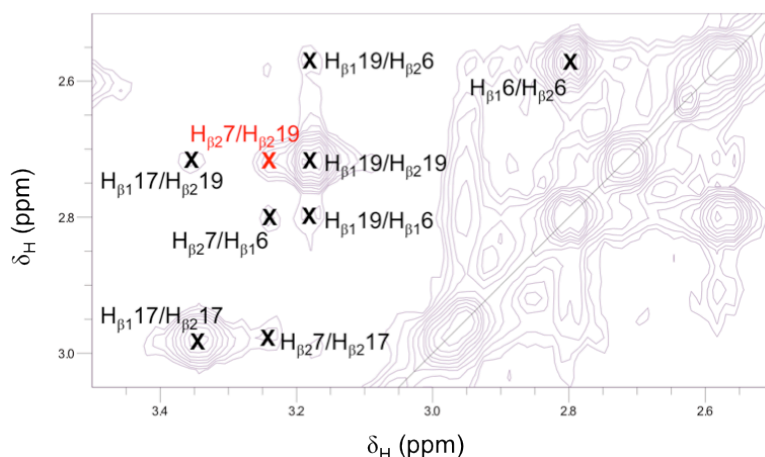


Figure 58 : Régions des déplacements chimiques des corrélations entre protons H_{α} et H_{β} (NOESY, 300 ms, 298 K, H_2O , 950 MHz). On remarquera la tache de corrélation entre les protons $H_{\beta}7$ et $H_{\beta}19$ (en rouge), témoin d'un rapprochement spatial entre ces deux résidus susceptibles de former un pont disulfure.

III.1.3. Paramètres conformationnels

Les paramètres conformationnels (les constantes de couplage $^3J_{HNH_{\alpha}}$, les écarts de déplacements chimiques des H_{α} CSD- H_{α} et les coefficients de température des protons amide $\Delta\delta/\Delta T_{HN}$) ont été mesurés pour la svicéucine et rassemblés dans le Tableau 18. Les constantes de couplage $^3J_{HNH_{\alpha}}$ ont servi à évaluer les angles dièdres pour la modélisation moléculaire.

Les CSD- H_{α} (Figure 59) ne permettent pas d'identifier une structure secondaire pour le peptide. En effet, on ne retrouve pas de régions de la svicéucine présentant des CSD- H_{α} homogènes positifs ou négatifs, révélant une structure secondaire étendue ou en hélice α . Ces CSD- H_{α} montrent en fait une alternance de valeurs positives et négatives, généralement indicatrice d'une structure irrégulière incluant des tours β . L'analyse des coefficients de température montre que certains résidus possèdent des coefficients très faibles (notamment Cys7, Asp9 et Ile18). Ceci suggère qu'ils sont potentiellement engagés dans des liaisons hydrogène ou tout du moins que leurs protons sont difficilement accessibles au solvant.

Tableau 18 : Constantes de couplage, coefficients de température des protons amides et CSD des résidus de la svicéucine. n.d. : non-déterminé.

Résidu	$^3J_{\text{HNH}\alpha}$ (Hz)	$-\Delta\delta/\Delta T_{\text{HN}}$ (ppb.K ⁻¹)	CSD (ppm)
Cys1	n.d.	7,3	-0,26
Val2	9,9	5,7	-0,69
Trp3	8,6	10,9	-0,47
Gly4	n.d.	7,2	0,13
Gly5	n.d.	8	-0,32
Asp6	8,9	8,9	0,1
Cys7	8,2	0,3	0,59
Thr8	8,6	8,4	-0,36
Asp9	9,9	0,9	0,45
Phe10	7,9	4,5	-0,24
Leu11	n.d.	n.d.	n.d.
Gly12	n.d.	10,8	-0,68
Cys13	n.d.	n.d.	n.d.
Gly14	7,1	10,8	0,71
Thr15	11	3,8	-1,06
Ala16	10	2,8	0
Trp17	9,6	5,6	-0,13
Ile18	n.d.	0,8	0,88
Cys19	9,4	7,7	-0,2
Val20	8,8	6	0,16

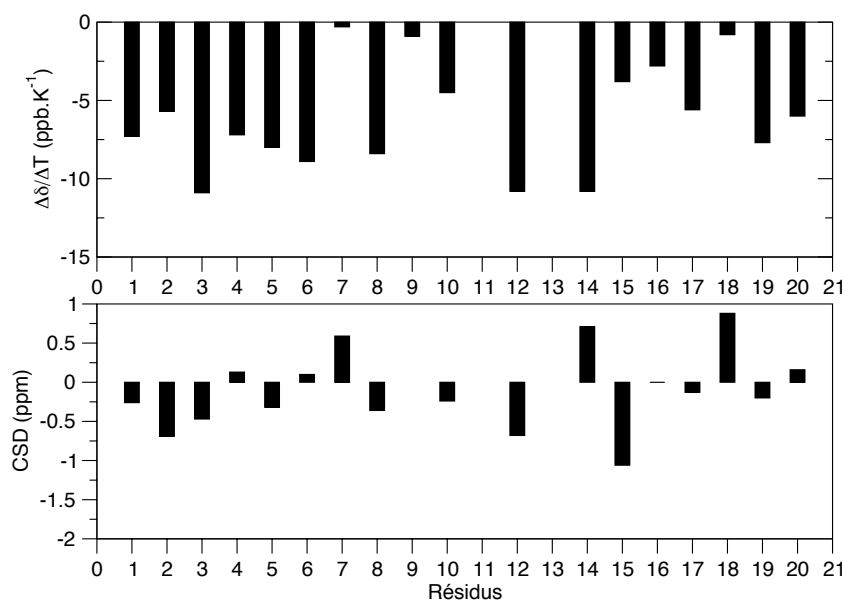


Figure 59 : Représentation graphique des coefficients de température et des CSD-H_α des résidus de la svicéucine.

III.2. Modélisation sous contraintes RMN

L'étude des courbes de NOE « build-up » obtenues à partir de spectres NOESY réalisés avec des temps de mélange différents ($\tau_m = 50, 80, 150, 200, 300$ et 500 ms) a permis de sélectionner le spectre NOESY ayant un $\tau_m = 150$ ms pour s'affranchir du phénomène de diffusion de spin. Ce spectre NOESY a permis d'obtenir un fichier de contraintes de distance qui pourra être utilisé dans la modélisation moléculaire. Comme le profil des spectres NOESY était similaire dans le méthanol et l'eau, les taches NOE ont été analysées sur les spectres enregistrés dans d_3 -MeOH car le signal était plus intense et mieux exploitable que dans H_2O .

Nous avons pu déterminer 163 contraintes de distances, dont 61 intra-résidus, 41 séquentielles, 55 moyenne et longue distances, et 6 ambiguës ; par ailleurs, l'analyse des constantes de couplage $^3J_{HNH\alpha}$ a fourni 12 contraintes d'angle ϕ (voir fichiers de contraintes, Annexe 2).

Le protocole de modélisation moléculaire utilisé sous X-PLOR a tenu compte des différents arrangements possibles des ponts disulfure bien qu'une tache de corrélation NOE nous ait donné un argument de poids en faveur de l'appariement Cys1/Cys13 et Cys7/Cys19. Nous avons ainsi modélisé un gabarit sans pont disulfure comprenant le cycle macrolactame et la queue C-terminale libre. Une première étape de recuit simulé a conduit à un jeu de 100 structures sans pont disulfure. Avec l'analyse du rapprochement spatial des cystéines, nous avons confirmé l'arrangement Cys1/Cys13 et Cys7/Cys19 et fixé ainsi les ponts disulfure. Un deuxième recuit simulé avec ces ponts disulfure imposés sur les 100 premières structures a donné un deuxième jeu de 100 structures qui a subi une dernière étape de minimisation d'énergie pour obtenir le jeu de structures final (Figure 60).

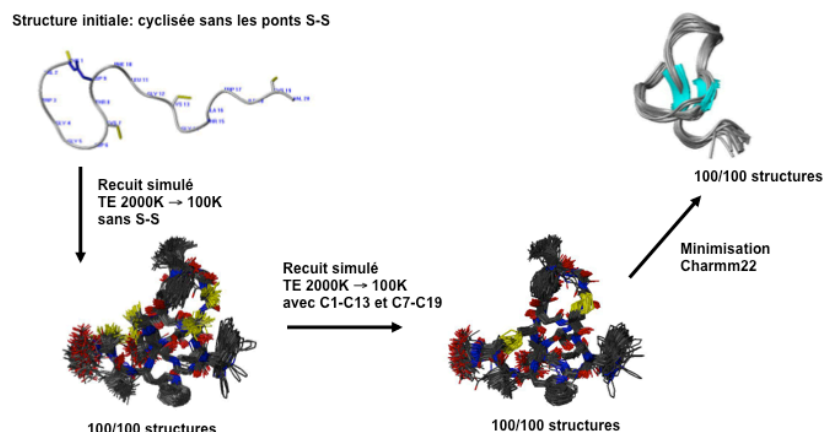


Figure 60 : Schéma du protocole de modélisation de la svcéucine (voir détails dans Matériel et méthodes).

III.3. Structure tridimensionnelle de la svcéucine

Les 20 structures présentant les énergies les plus basses après l'étape de minimisation (Tableau 19) et ne possédant aucune violation de contraintes RMN de distance $> 0,2 \text{ \AA}$ et d'angle $> 5^\circ$, ont été sélectionnées (Figure 63).

Le diagramme de Ramachandran des structures sélectionnées montre que près de 60 % des résidus de ces structures se trouvent dans les régions favorables, et environ 40 % dans des régions autorisées (Figure 61).

L'analyse des écarts quadratiques moyens (« root-mean-square deviation », RMSD) entre la structure moyenne et la famille de 20 structures montre que le RMSD des atomes du squelette est inférieur à $1 \text{ \AA}$, ce qui indique une bonne structuration du squelette. Les RMSD des atomes des chaînes latérales sont plus élevés, suggérant que les chaînes latérales n'adoptent pas d'orientation privilégiée à l'exception des résidus Asp9, Thr15, Ala16 et Trp17. La chaîne latérale de Asp9 est engagée dans une liaison peptidique avec Cys1, il est donc normal que le RMSD de ses atomes soit plus faible. On peut noter que les résidus Thr15, Ala16 et Trp17 sont situés de part et d'autre du cycle macrolactame (Thr15 et Ala16) ou sont susceptibles de verrouiller un peu plus la structure lasso par les contraintes stériques qu'ils impliquent (Trp17). Ceci se retrouve dans l'analyse des RMSD des atomes de leurs chaînes latérales qui sont plus faibles et témoigne d'une orientation privilégiée des chaînes.

Tableau 19 : Paramètres énergétiques et structuraux des 20 structures sélectionnées de la svcéucine.

Paramètres énergétiques (kcal.mol⁻¹)	
Liaisons	8,21 ± 0,12
Angles	23,92 ± 0,73
Dièdres	66,48 ± 1,6
Impropres	1,07 ± 0,09
Van der Waals	-42,73 ± 1,5
Electrostatiques	1,36 ± 0,16
Contraintes NOE	1,93 ± 0,07
Contraintes des angles dièdres	0,04 ± 0,04
Energie totale	60,3 ± 1,2
RMSD	
Liaisons (Å)	0,01 ± 0
Angles (°)	1,81 ± 0,03
Impropres (°)	1,64 ± 0,11
Atomes du squelette (résidus 1-20) (Å)	0,47 ± 0,16
Atomes lourds (résidus 1-20) (Å)	1,02 ± 0,22
Ramachandran	
Dans les régions favorables	57,9%
Dans les régions additionnelles autorisées	39,3%
Dans les régions généreusement autorisées	2,9%
Dans les régions non-autorisées	0%

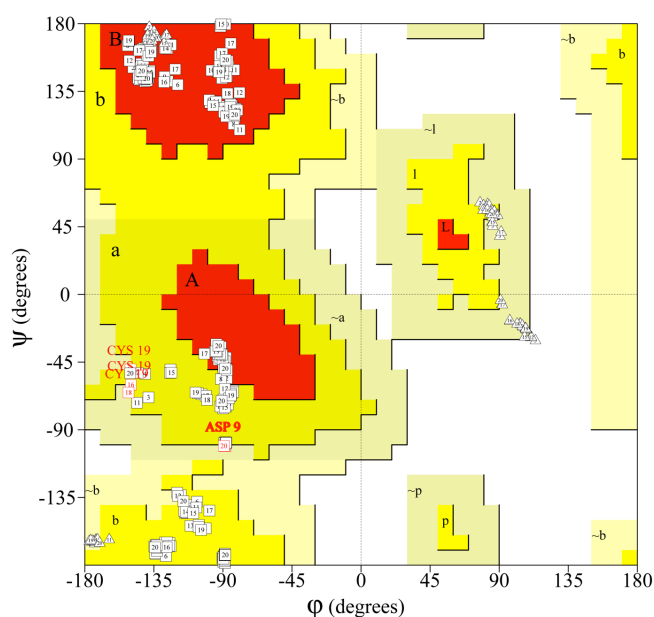


Figure 61 : Diagramme de Ramachandran des résidus des 20 structures sélectionnées de la svcéucine. Les régions favorables sont représentées en rouge, les régions additionnelles autorisées en jaune, les régions généreusement autorisées en jaune pâle et les régions non-autorisées en blanc.

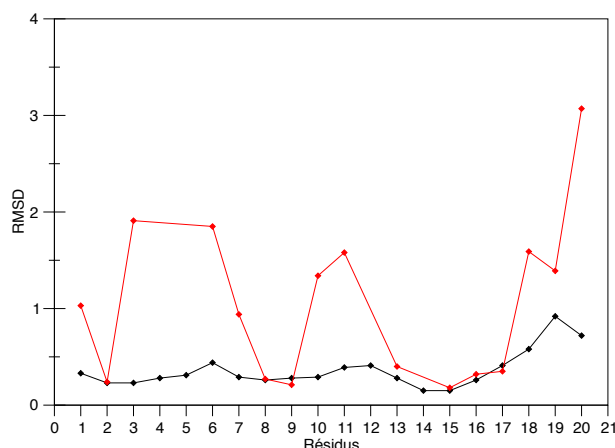


Figure 62 : Représentation de l'écart quadratique moyen (RMSD) en Å entre la structure moyenne et la famille de structures (X-PLOR). Les RMSD des atomes du squelette sont représentés en noir et ceux des atomes des chaînes latérales en rouge.

La structure tridimensionnelle de la svicéucine (déposée dans la PDB sous le numéro **2LS1**) met en évidence le cycle macrolactame constitué des neuf premiers résidus, les deux ponts disulfure Cys1/Cys13 et Cys7/Cys19, et un court feuillet β antiparallèle entre les résidus Cys7 et Thr8 du cycle et les résidus Thr15 et Ala16 de la partie C-terminale. Par ailleurs, le résidu Trp17, situé sous le cycle macrolactame, peut participer au piégeage stérique de la queue C-terminale, en plus des ponts disulfure.

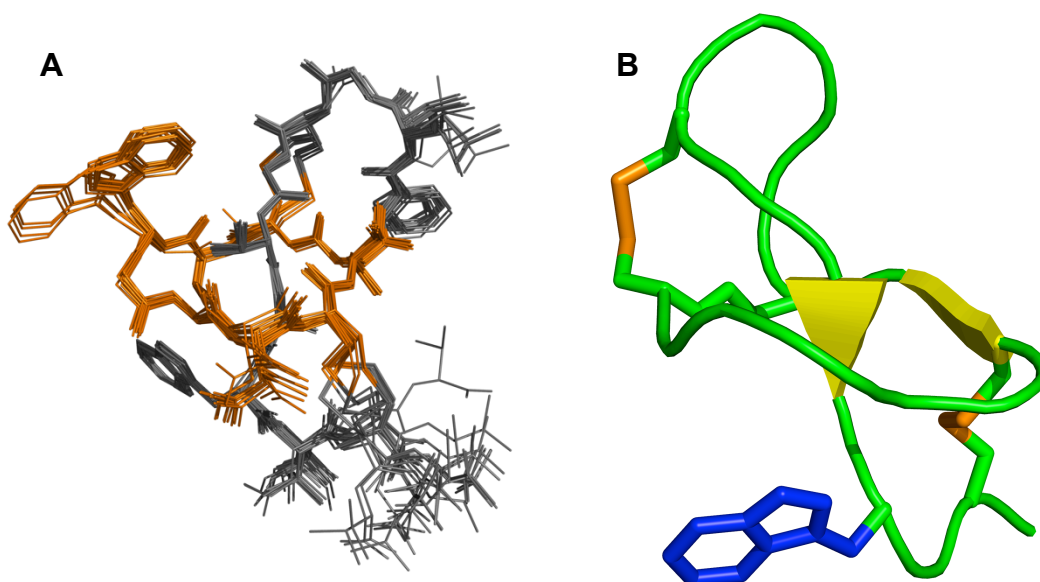


Figure 63 : A) Superposition des 20 structures sélectionnées. Les résidus du cycle macrolactame sont représentés en orange, ceux de la queue C-terminale en gris. **B) Structure de la svicéucine.** La chaîne latérale du résidu Trp17 est représentée en bleu.

La superposition de notre structure de la svicéucine avec celle de RP-71955 (PDB 1RPB) montre la conservation de la structure pour les peptides lasso de classe I (Figure 64). Les différences entre ces deux structures peuvent se résumer en l'absence chez RP-71955 d'un résidu encombrant comme Trp17 et la présence d'un 21^e résidu en C-terminal de RP-71955.

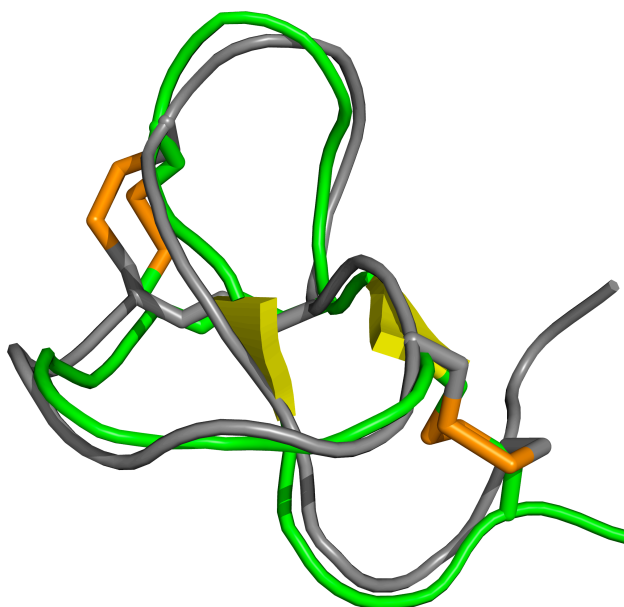


Figure 64 : Superposition des structures tridimensionnelles de la svicéucine et de RP-71955. La svicéucine est représentée en vert et RP-71955 en gris.

RP-71955 est un peptide antibactérien et antiviral. Son activité antivirale repose sur une interaction avec HIV-1 chez lequel il inhibe l'activité de l'aspartyl-protéase¹³⁷. La siamycine I, avec qui RP-71955 partage plus de 90 % d'identité de séquence, interagit avec les glycoprotéines gp41 et gp120 de la membrane de HIV-A, ce qui empêche la fusion du virus avec la cellule-cible. Outre cette activité antivirale, les siamycines I et II possèdent une activité antibactérienne contre des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Bacillus*). La svicéucine présente une activité antibactérienne proche de celle des siamycines.

La représentation des résidus selon leur polarité et leur hydrophobie pour ces deux peptides (Figure 65) montre que nous pouvons distinguer deux « faces » communes. La première (A et B) comprend de nombreux résidus polaires ou acides (vert). En revanche, la deuxième face (C et D) est pratiquement uniquement composée de résidus hydrophobes (blanc).

Nous faisons l'hypothèse ici que ces faces polaire et apolaire interviennent

dans le mécanisme d'action de ces peptides sans pour autant connaître leurs rôles précis.

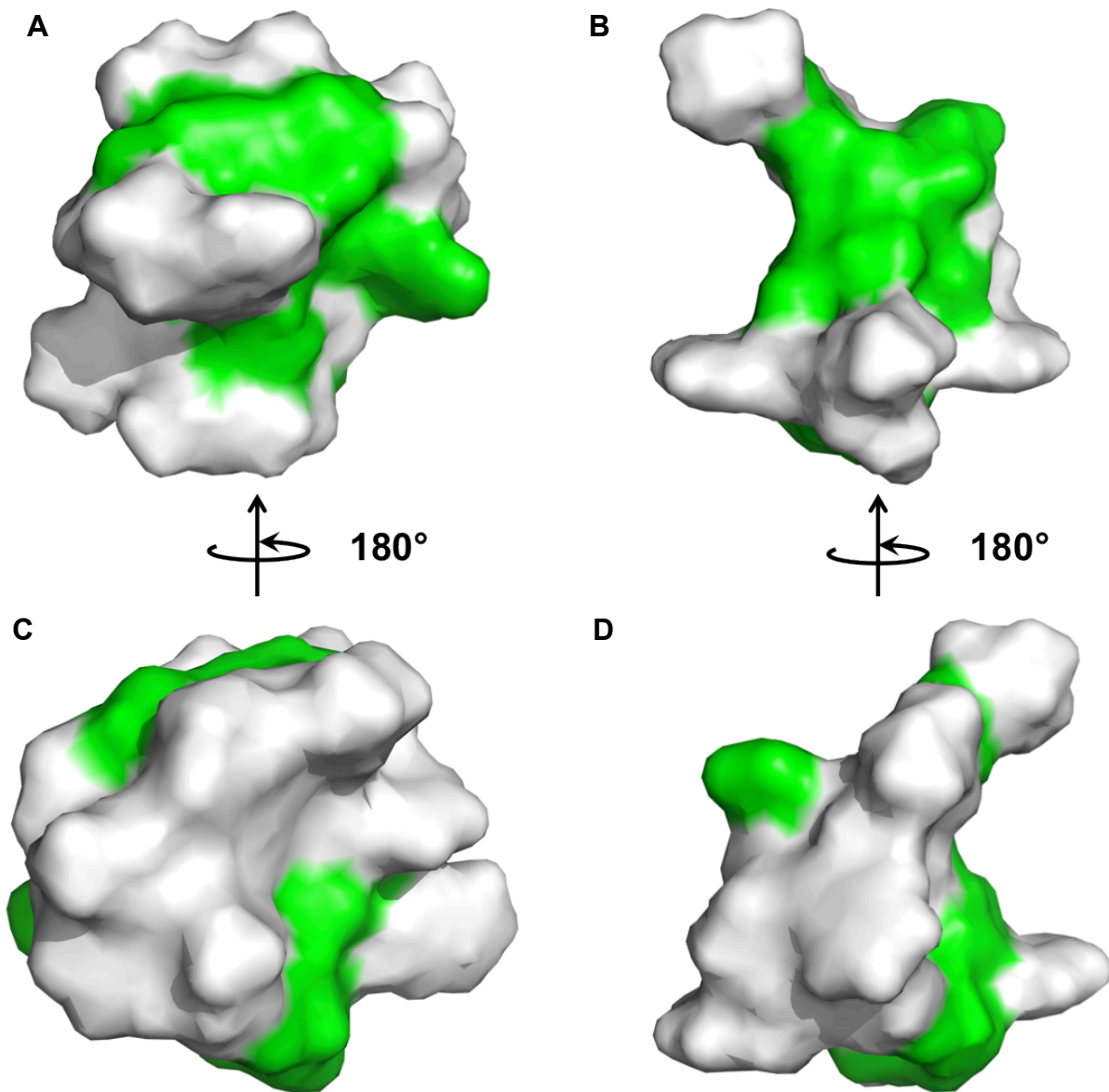


Figure 65 : Comparaison de la répartition de la polarité à la surface de RP-71955 et la svicéucine. Faces polaires de RP-71955 (A) et de la svicéucine (B). Faces hydrophobes de RP-71955 (C) et de la svicéucine (D). Les résidus hydrophobes sont représentés en blanc (calcul du logiciel PyMol).

Conclusion

La svicéucine est un peptide lasso de classe I, produit par *Streptomyces sviceus*, dont le cycle macrolactame est constitué par les neufs résidus N-terminaux, avec une liaison lactame établie entre Cys1 et la chaîne latérale d'Asp9. Les ponts disulfure impliquent l'appariement de Cys1 avec Cys13 et de Cys7 avec Cys19 ainsi

que l'ont montré les expériences de RMN et les calculs de modélisation moléculaire sous contraintes RMN.

La structure tridimensionnelle montre une similarité structurale importante avec le peptide RP-71955. Ce peptide, dont la structure lasso est connue depuis le milieu des années 1990, est un antiviral dirigé contre HIV-1 et possède plus de 90 % d'identité de séquence avec les siamycines I et II, molécules antivirales et antibactériennes.

La svicéucine possède une activité antibactérienne, avec une CMI de l'ordre du μM , contre des souches à Gram positif. Sa similarité de structure avec les autres peptides de classe I suggère qu'elle présenterait aussi des similitudes quant à son mécanisme d'action. Ses faces hydrophobes et polaires sont sans doute impliquées dans son activité antibactérienne. La svicéucine présente un spectre d'activité antibactérienne plus large que les autres peptides lasso : elle est active contre des souches qui sont plus éloignées phylogénétiquement de la souche productrice que dans le cas des peptides lasso de type II (MccJ25 et capistruine).

Par ailleurs, le mécanisme d'action de MccJ25 et de la capistruine qui cible l'ARNpol, suggère que l'activité antibactérienne des peptides lasso nécessite une cible intracellulaire. Les peptides lasso de classe I pourraient également interagir avec une cible située dans le cytoplasme de la bactérie cible. Une interaction polaire ou apolaire de ces peptides avec leur cible pourrait être mise en jeu dans leur mécanisme d'action.

Chapitre IV : Etudes spectroscopiques de peptides lasso

Introduction

Les analyses par RMN et MS/MS de MccJ25 et de ses variants ont révélé des profils différents selon qu'ils étaient structurés en lasso ou bien sous forme cyclique branchée. Ceci suggère qu'une signature de la topologie lasso pourrait être identifiée par d'autres méthodes spectroscopiques, comme le CD. Le spectre CD particulier du peptide RES-701-1 par rapport à son analogue linéaire²³² renforce cette hypothèse.

De plus, la topologie bloquée stériquement des peptides lasso suggère une dynamique interne particulière. Celle-ci pourrait jouer un rôle important dans l'interaction de ces peptides avec des protéines impliquées dans leurs activités biologiques.

Nous avons donc entrepris une étude spectroscopique de peptides lasso. Nous avons examiné la relaxation ^{15}N de MccJ25 afin d'essayer de dégager, outre les paramètres structuraux, des paramètres de dynamique du peptide. Nous avons également étudié le signal CD de différents peptides lasso afin d'examiner si cette topologie est associée à une signature particulière.

I. Dynamique de MccJ25 par relaxation de spin ^{15}N

I.1. Structures tridimensionnelles de MccJ25 et spectres HSQC

La structure de MccJ25 a été résolue dans différentes conditions par différentes équipes^{143,145–147}. Deux familles de structures de MccJ25 ont été déposées dans la PDB (1Q71¹⁴⁵ : MeOH, 298 K ; 1PP5¹⁴⁶ : MeOH, 298 K). En les superposant et en les alignant sur le cycle macrolactame, on observe que ces deux structures ne se superposent pas au niveau de la boucle en épingle à cheveux (Figure 66), définissant deux états conformationnels de MccJ25. Par ailleurs, au sein d'une même famille de structures, chaque structure se superpose bien aux autres et

on n'observe pas de distribution des structures entre les deux conformations. L'une de ces deux familles (1PP5) présente un coude au niveau des résidus Tyr9 et Pro16. Cette observation suggère que MccJ25 peut adopter différentes conformations et que ses deux régions (boucle et cycle/queue) peuvent présenter une certaine mobilité l'une par rapport à l'autre.

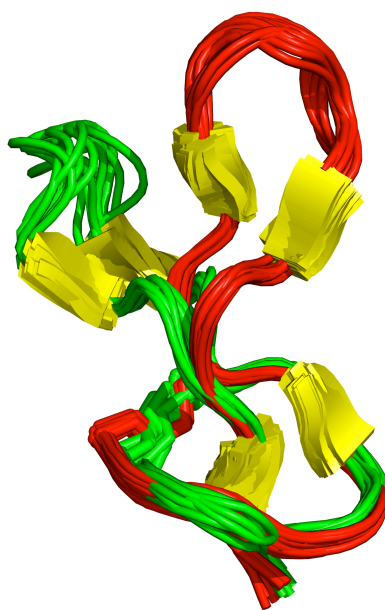


Figure 66 : Superposition des deux familles de structures de MccJ25 déposées dans la PDB. 1Q71¹⁴⁵ (rouge) et 1PP5¹⁴⁶ (vert).

La boucle et le cycle macrolactame de MccJ25 semblent présenter une dynamique différente ainsi que le montre la superposition des structures. Chacune de ces régions est impliquée dans une étape particulière du mécanisme d'action de MccJ25 : la boucle est la zone de reconnaissance du peptide par le récepteur FhuA²⁰⁶ alors que le cycle associé à la partie C-terminale interagit avec l'ARNpol²⁰⁷.

L'interaction entre deux protéines est liée à la structure primaire (caractéristiques chimiques des résidus) ainsi qu'à la structure tridimensionnelle (formation de sites d'interaction et de réaction) de chacune, mais aussi à la dynamique et aux mouvements internes de chaque protéine. Ceci leur permet de franchir des barrières d'énergie et d'adopter temporairement des configurations plus favorables à une interaction.

MccJ25 est susceptible de présenter une dynamique interne particulière compte-tenu de sa structure originale. Des spectres HSQC ¹⁵N dans H₂O enregistrés à différentes températures (le spectre à 308 K est représenté Figure 67A) ont permis

de visualiser la présence de taches supplémentaires, alors que tous les résidus avaient été identifiés. Des expériences d'échange ZZ nous ont permis d'attribuer ces taches à une forme minoritaire de MccJ25. L'échange entre les deux formes est lent sur l'échelle des déplacements chimiques. Les résidus présentent des différences de déplacement chimique ^1H ($|\Delta\delta_{\text{H}}|$) plus ou moins importantes (Figure 67B et Tableau 20). Les résidus du cycle macrolactame et de la queue C-terminale possèdent des $|\Delta\delta_{\text{H}}|$ inférieurs à 0,10 ppm et des $|\Delta\delta_{\text{N}}|$ inférieurs à 0,50 ppm alors que ceux de la boucle ont des $|\Delta\delta_{\text{H}}|$ supérieurs à 0,10 ppm et des $|\Delta\delta_{\text{N}}|$ supérieurs à 0,50 ppm (à l'exception d'Ile13, présentant un $|\Delta\delta_{\text{N}}| = 0,35$ ppm). Ces différences suggèrent que les résidus de la boucle subissent un changement d'environnement plus important que ceux du cycle et de la queue C-terminale. Ceci est cohérent avec une différence de conformation plus importante dans la boucle que dans le cycle qui pourrait s'expliquer par un équilibre cis-trans des prolines.

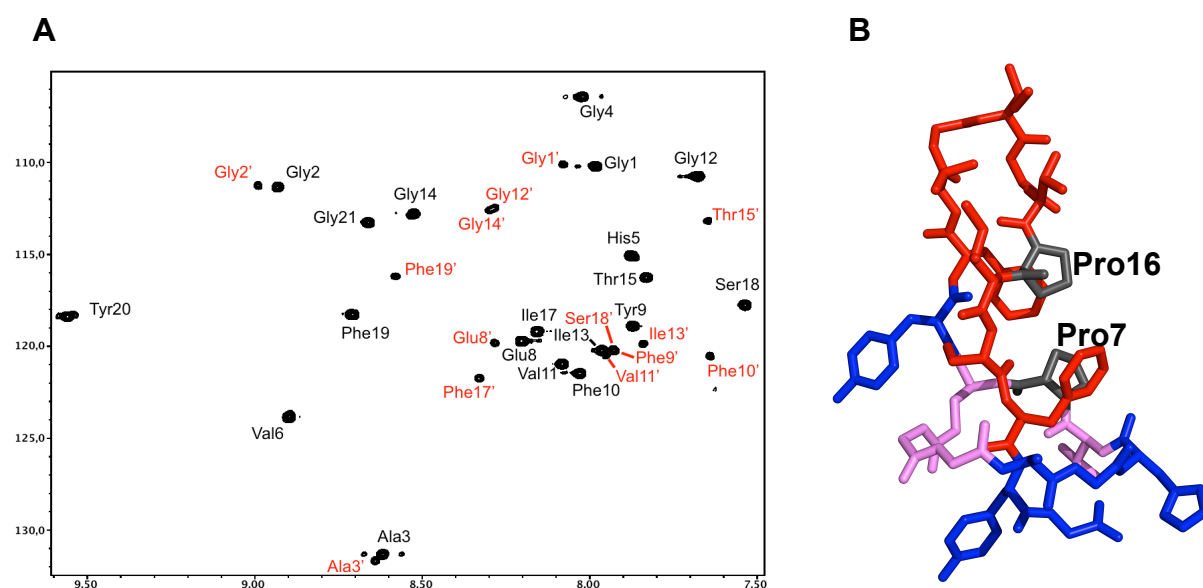


Figure 67 : A) Spectre HSQC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ de MccJ25- ^{15}N à 308 K (H_2O , 950 MHz). Les résidus de la forme majoritaire de MccJ25 sont notés en noir et les résidus de la forme minoritaire en rouge (notés ' '). **B) Représentation des résidus selon leur différence de déplacements chimiques ^1H (H_2O , 308 K, 950 MHz) entre les deux conformations de MccJ25.** Bleu : $|\Delta\delta_{\text{H}}| < 0,05$ ppm ; magenta : $0,05 \text{ ppm} < |\Delta\delta_{\text{H}}| < 0,10$ ppm ; rouge : $|\Delta\delta_{\text{H}}| > 0,10$ ppm. Les prolines, pour lesquelles aucune donnée n'est disponible, sont représentés en gris et indiquées.

Tableau 20 : Différences de déplacements chimiques ^1H et ^{15}N entre les deux formes des résidus de MccJ25 (H_2O , 950 MHz, 308 K).

Résidus	$\Delta\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\Delta\delta_{\text{N}}$ (ppm)
Gly1	0,10	0,13
Gly2	0,06	0,08
Ala3	0,02	0,33
Gly4	0	0
His5	0,02	0,09
Val6	0	0
Pro7	-	-
Glu8	0,08	0,08
Tyr9	0,05	1,42
Phe10	0,39	0,93
Val11	0,13	0,51
Gly12	0,60	1,69
Ile13	0,12	0,35
Gly14	0,36	0,67
Thr15	0,21	1,16
Pro16	-	-
Ile17	0,17	2,51
Ser18	0,39	2,47
Phe19	0,12	2,07
Tyr20	0,02	0,07
Gly21	0	0

Ce comportement de la boucle en épingle à cheveux de MccJ25 semble se produire dans toutes les conditions de solvation du peptide puisqu'on observe les taches de corrélation d'un conformère de MccJ25 dans MeOH également (voir spectres HSQC à différentes températures de MccJ25- ^{15}N dans MeOH Annexe 3).

Les structures calculées de MccJ25 et déposées dans la PDB ont été résolues dans MeOH. On a donc deux structures qui ont été résolues dans le même solvant mais représentant chacune un conformère différent de MccJ25. Chacune de ces familles de structures a été calculée avec un nombre de contraintes NOE relativement faible (112 contraintes de distance pour 1Q71 et 179 pour 1PP5), et une différence dans la détermination d'un résidu peut changer localement la structure lors du calcul de modélisation moléculaire. Ceci pourrait expliquer les différences de structure dans les deux ensembles déposés dans la PDB.

Nous avons étudié la relaxation ^{15}N de MccJ25 dans deux solvants, MeOH et H_2O , afin de déterminer la dynamique de ce peptide. Dans MeOH, les données ont été enregistrées à 700 MHz et à deux températures (298 K et 308 K). Dans H_2O , les

données ont été enregistrées à deux champs différents (600 et 950 MHz) et à trois températures (288 K, 298 K et 308 K). La détermination des paramètres de relaxation ainsi que l'analyse « model-free » présentée par la suite dans H₂O a été effectuée à 950 MHz, les résultats obtenus à 600 MHz sont présentés en annexe (Annexe 4).

I.2. Détermination des paramètres de relaxation ¹⁵N (R_1 , R_2 et $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -hetNOE)

Les paramètres de relaxation permettent de décrire la mobilité interne d'une protéine ou d'un peptide et de dégager un modèle de comportement dynamique. L'étude des paramètres ¹⁵N R_1 , ¹⁵N R_2 et $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -hetNOE permet de calculer une fonction de densité spectrale $J(\omega)$ que l'on peut relier dans le meilleur des cas à la dynamique de la molécule (voir Matériel et méthodes, V.3).

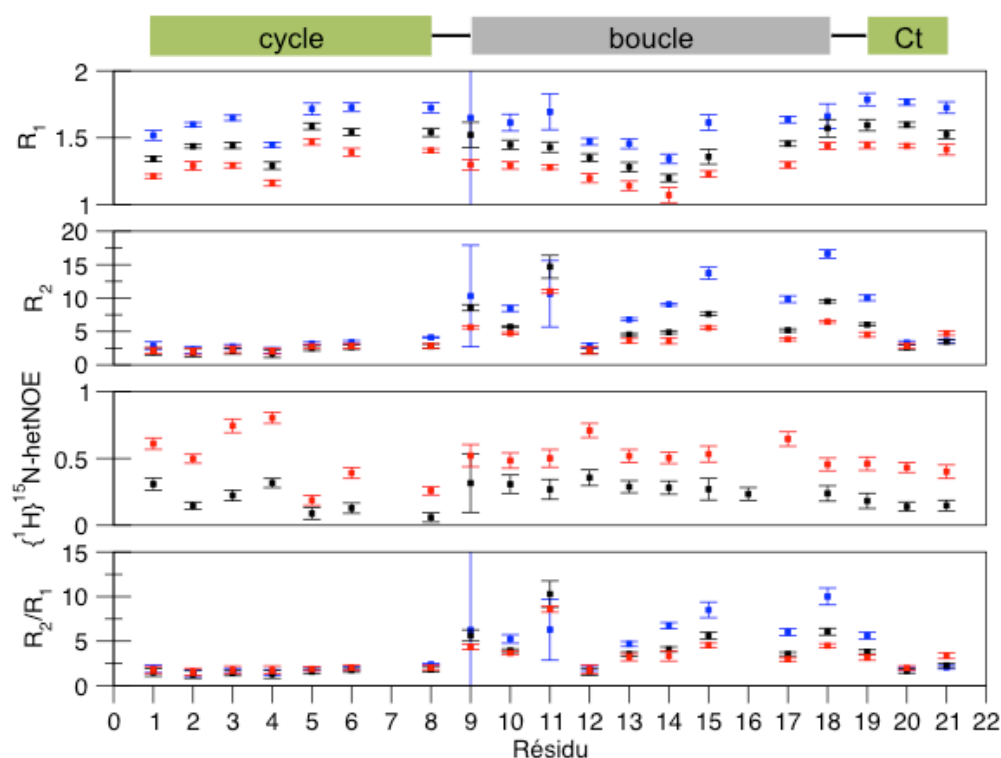


Figure 68 : Paramètres R_1 (en s⁻¹), R_2 (en s⁻¹) et $\{^1\text{H}\}^{15}\text{N}$ -hetNOE de MccJ25 enregistrés dans MeOH, à 700 MHz, à 288 K (bleu), 298 K (noir) et 308 K (rouge).

L'étude des paramètres de relaxation dans MeOH suggère que MccJ25 présente dans ce milieu deux régions de dynamique différente (Figure 68). Les

paramètres de relaxation spin-réseau (R_1) sont similaires pour chaque résidu de MccJ25 avec quelques légères différences notamment pour les résidus 10 à 14 chez lesquels on peut observer qu'il diminue. On remarque une différence de relaxation spin-spin (R_2) entre les résidus formant la boucle (résidus 9 à 18) et les résidus du cycle et la fin de la queue C-terminale (résidus 1-8 et 19-21). Les acides aminés du cycle et de la queue possèdent une relaxation R_2 plus faible que celle des résidus de la boucle. Ces observations laissent penser que les deux régions (boucle ou cycle associé à la partie C-terminale) possèdent une dynamique différente dans MeOH. L'élévation du R_2 dans la boucle, associée à des valeurs de R_1 et NOE similaires à celles du cycle, peut laisser penser à une contribution significative de l'échange conformationnel (R_{ex}) dans cette région. Ceci pourrait donc suggérer que la boucle pourrait s'interconvertir entre plusieurs conformations dans une gamme de temps de la μs -ms. Ce phénomène dynamique se rajouterait à l'échange lent déjà précédemment observé.

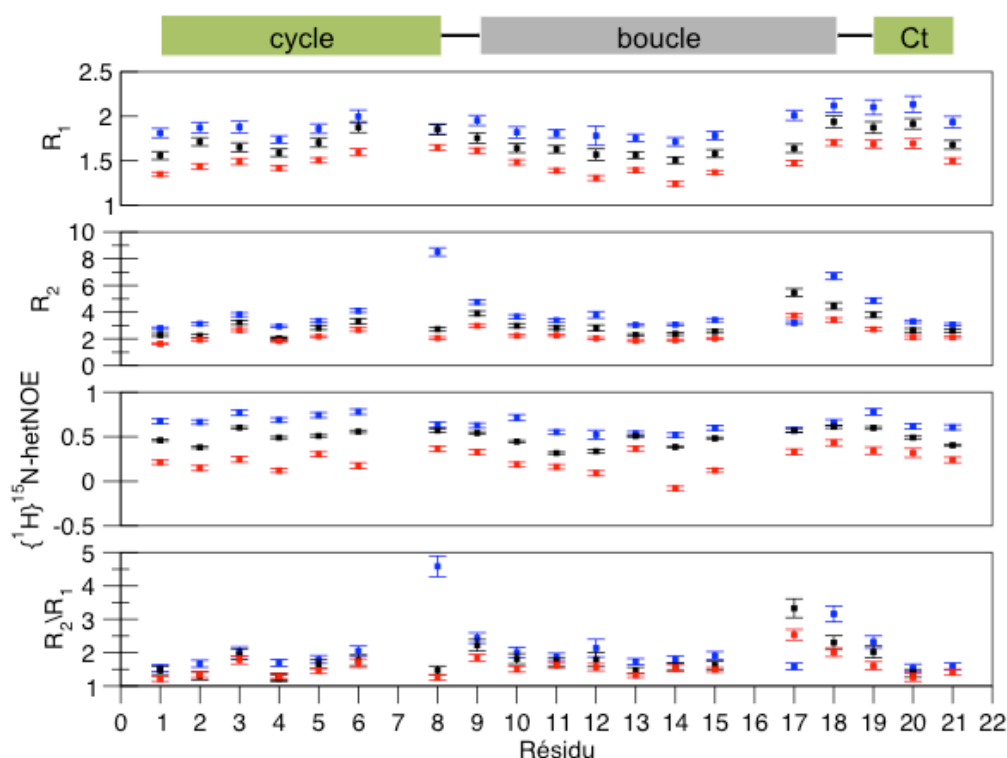


Figure 69 : Paramètres R_1 (en s^{-1}), R_2 (en s^{-1}) et $\{^1H\}^{15}N$ -hetNOE de MccJ25 enregistrés dans H_2O , à 950 MHz à 288 K (bleu), 298 K (noir) et 308 K (rouge).

Concernant les données collectées dans l'eau (Figure 69), nous ne retrouvons plus la différence de relaxation spin-spin (R_2) entre les résidus de la

boucle et les résidus du cycle macrolactame. Les valeurs de R_1 , R_2 et du rapport R_2/R_1 sont homogènes à l'exception notable des résidus « frontières » entre les deux régions (Glu8, Tyr9 d'une part et Ile17, Ser18 et Phe19 d'autre part) qui possèdent des R_2 plus élevés. C'est notamment le cas des résidus de la fin de la boucle, proches du cycle macrolactame (Ile17 et Ser18). Ces résultats suggèrent qu'il y a effectivement une différence de dynamique interne à ce niveau du peptide. Le Tableau 21 rassemble les paramètres de relaxation moyens pour chaque solvant et chaque température.

Les données récoltées dans les deux solvants montrent que MccJ25 présente des différences de mobilité entre ses deux régions structurales. Bien que sa structure soit très compacte et stable, elle présente néanmoins des zones où les contraintes semblent moins importantes et permettent donc l'existence d'une dynamique interne que nous allons tenter de modéliser par la suite.

Tableau 21 : Paramètres de relaxation ^{15}N moyens de MccJ25 dans les deux solvants et à trois températures différentes. Les données obtenues dans H_2O ont été enregistrées à 950 MHz, les données dans MeOH à 700 MHz.

Solvant	Température (K)	$\langle R_1 \rangle \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\langle R_2 \rangle \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$\langle R_2/R_1 \rangle$
MeOH	288	$1,62 \pm 0,12$	$6,62 \pm 1,01$	$4,10 \pm 1,06$
	298	$1,45 \pm 0,03$	$4,76 \pm 0,42$	$3,29 \pm 0,39$
	308	$1,30 \pm 0,03$	$3,99 \pm 0,33$	$3,06 \pm 0,33$
H_2O	288	$1,89 \pm 0,06$	$3,94 \pm 0,15$	$2,07 \pm 0,15$
	298	$1,69 \pm 0,05$	$2,98 \pm 0,16$	$1,76 \pm 0,15$
	308	$1,49 \pm 0,03$	$2,33 \pm 0,10$	$1,56 \pm 0,10$

I.3. Calcul des paramètres dynamiques par approche « model-free »

Les données de relaxation fournissent d'intéressantes informations afin de décrire la mobilité interne d'une protéine ou d'un peptide. Etant reliées à la fonction de densité spectrale, elles nous permettent d'évaluer des paramètres dynamiques pour chaque résidu ou région du peptide. Dans le cas de MccJ25, nous avons utilisé le logiciel DYNAMICS²⁷⁷ afin de dégager un tenseur de diffusion pour le peptide, ainsi qu'un modèle dynamique pour chaque résidu. Pour cela, nous nous sommes intéressés au peptide entier, puis nous avons séparé le peptide selon ses deux régions (boucle et cycle/C-terminal).

La description de la diffusion de MccJ25 par un tenseur de diffusion isotrope,

c'est-à-dire par un unique temps de corrélation τ_m identique pour chaque résidu, a semblé satisfaisante. Le Tableau 22 rassemble les valeurs retenues de τ_m ainsi que le paramètre statistique χ^2/df qui détermine la fiabilité des modèles pour la valeur du tenseur τ_m .

Tableau 22 : Tenseurs de diffusion isotropes de MccJ25 en entier et de ses régions dans chaque solvant et à différentes températures. df : degrés de liberté. Les résultats dans MeOH utilisées proviennent des données enregistrées à 700 MHz et ceux dans H₂O des données enregistrées à 950 MHz.

	Solvant	Température (K)	τ_m (ns)	χ^2/df
MccJ25	MeOH	298	$2,0 \pm 0,5$	0,67
		308	$2,7 \pm 0,5$	1,14
	H ₂ O	288	$1,4 \pm 0,2$	2,57
		298	$1,1 \pm 0,3$	3,31
		308	$0,7 \pm 0,0$	2,80
1-8/19-21	MeOH	298	$2,0 \pm 0,6$	0,49
		308	$2,6 \pm 0,4$	0,56
	H ₂ O	288	$1,6 \pm 0,1$	1,96
		298	$1,0 \pm 0,2$	3,05
		308	$0,9 \pm 0,3$	2,24
9-18	MeOH	298	$1,5 \pm 0,2$	1,24
		308	$1,5 \pm 0,2$	2,25
	H ₂ O	288	$1,8 \pm 0,2$	1,90
		298	$1,6 \pm 0,2$	1,22
		308	$1,4 \pm 0,1$	0,93

Les temps de corrélation dans MeOH sont différents entre la boucle et le cycle de MccJ25. Cependant les rapports R_2/R_1 des résidus de la boucle sont plus élevés que ceux du cycle (Figure 68), témoignant d'une dynamique interne importante, ils ne peuvent donc pas être utilisés pour obtenir un temps de corrélation fiable. En revanche, les temps de corrélation obtenus pour le cycle sont déterminés à partir de données présentant des R_2 faibles (donc peu de dynamique interne) et sont très similaires à ceux obtenus pour le peptide dans son intégralité. Nous pouvons donc utiliser le τ_m du peptide en entier pour l'approche « model-free ».

Les temps de corrélation dans H₂O présentent moins de disparité car les R_2 des résidus sont plus homogènes que ceux obtenus dans MeOH, à l'exception des résidus Ile17 et Ser18 présentant un R_2 élevés. Les τ_m de la boucle sont significativement différents de ceux du cycle et de la boucle et étant donné la valeur de R_2 de Ile17 et Ser18, nous ne pouvons pas tenir compte de ces temps pour une

analyse « model-free ». En revanche, les τ_m du peptide dans son intégralité et du cycle sont relativement similaires. Le temps de corrélation global τ_m obtenu à partir du rapport R_2/R_1 moyen du peptide en entier semble être, malgré les résultats de la boucle, un modèle relativement fiable de description de la rotation globale isotrope du peptide.

Le calcul « model-free » pour chaque résidu de MccJ25 (Figure 70) a été effectué en prenant pour chaque solvant et chaque température le τ_m du peptide dans son entier évalué ci-dessus (Tableau 22). Dans MeOH, chaque résidu présente un paramètre d'ordre bien inférieur à celui qu'il possède dans l'eau et la température n'affecte pas notablement la dynamique des résidus. Dans H₂O, les résidus possèdent une dynamique de moins grande amplitude (*i.e.* leur $\langle S^2 \rangle$ est plus important) que dans MeOH mais la température semble accentuer les différences de dynamique entre résidus. Ainsi, on observe nettement à 308 K dans H₂O que les paramètres d'ordre décroissent au niveau des résidus de la boucle (du résidu 9 au résidu 15) puis remontent au niveau de la partie C-terminale. Dans les deux solvants, les résidus ont parfois été modélisés avec un paramètre d'échange R_{ex} . Si on exclut les valeurs pour lesquelles ce paramètre n'est pas significatif ($R_{ex} < 1 \text{ s}^{-1}$), on constate que les résidus qui sont modélisés avec de l'échange sont situés dans la boucle aux « frontières » avec le cycle. Dans MeOH, on ne trouve cet échange qu'à 298 K, notamment pour les résidus Tyr9, Val11 et Ser18. Dans H₂O, les résidus présentant de l'échange sont Glu8 et Ser18 (à 288 K), Ile17 et Ser18 (à 298 K), et Ile17 (à 308 K). La dynamique des résidus à l'interface entre les deux régions de MccJ25 est modélisée avec un phénomène d'échange entre deux états conformationnels, qui pourrait révéler un mouvement de charnière entre le cycle et la boucle à l'échelle de la μs -ms.

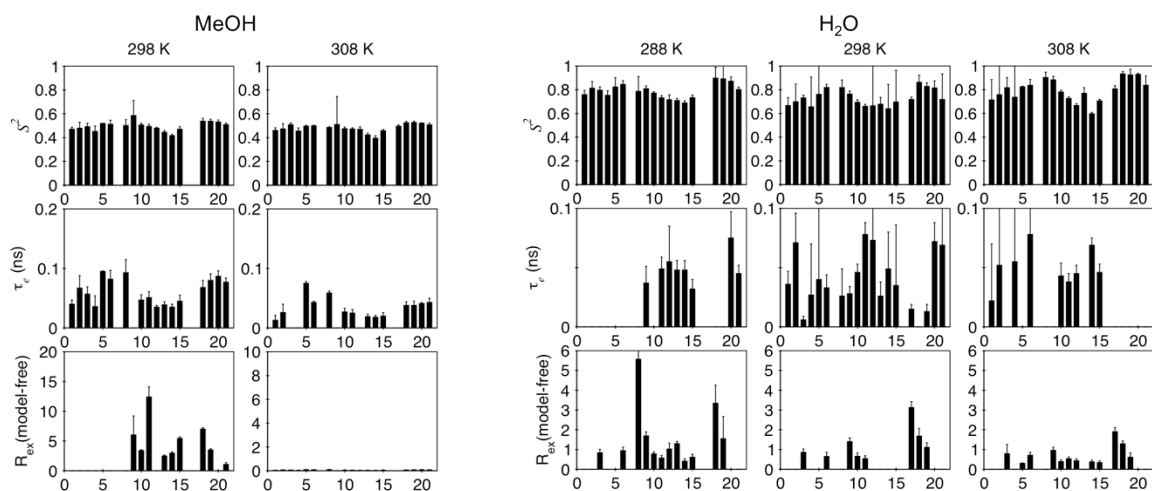


Figure 70 : Paramètres « model-free » de MccJ25 dans MeOH à 700 MHz (gauche) et H₂O à 950 MHz (droite). Dans chaque solvant, les températures étudiées sont représentées (298 et 308 K dans MeOH et 288, 298 et 308 K dans H₂O). De haut en bas, les paramètres d'ordre S^2 , le temps de corrélation interne τ_e (en ns) et le paramètre d'échange de la relaxation transverse R_{ex} (en s⁻¹) sont représentés.

Tableau 23 : Paramètres d'ordre moyen de MccJ25 en entier, de sa boucle et de son cycle macrolactame associé à sa queue C-terminale. Les résultats dans MeOH proviennent des données enregistrées à 700 MHz et ceux dans H₂O à 950 MHz.

	Solvant	Température (K)	$\langle S^2 \rangle$
MccJ25	MeOH	298	$0,50 \pm 0,03$
		308	$0,48 \pm 0,03$
	H ₂ O	288	$0,79 \pm 0,05$
		298	$0,73 \pm 0,12$
		308	$0,80 \pm 0,09$
1-8/19-21	MeOH	298	$0,50 \pm 0,03$
		308	$0,49 \pm 0,01$
	H ₂ O	288	$0,75 \pm 0,04$
		298	$0,79 \pm 0,13$
		308	$0,68 \pm 0,14$
9-18	MeOH	298	$0,51 \pm 0,03$
		308	$0,51 \pm 0,03$
	H ₂ O	288	$0,70 \pm 0,04$
		298	$0,60 \pm 0,04$
		308	$0,48 \pm 0,04$

Dans MeOH, le paramètre d'ordre moyen de MccJ25 à 298 K ($\langle S^2 \rangle = 0,50 \pm 0,03$) est cohérent avec des mouvements d'amplitude significative ($S^2 < 0,8$). En revanche, dans H₂O à 298 K, le peptide présente un caractère beaucoup plus rigide ($\langle S^2 \rangle = 0,73 \pm 0,12$). Les paramètres d'ordre moyens ne varient pas de manière significative avec la température (Tableau 22). Ces résultats suggèrent que la

polarité de H₂O permet à MccJ25 d'établir des liaisons hydrogène avec H₂O, ce qui a pour effet de rigidifier son squelette peptidique. La moindre polarité de MeOH ne permet pas à de telles liaisons de s'établir, ce qui permet des mouvements plus amples. Ceci est en accord avec les mouvements supplémentaires observés dans la gamme μ s-ms pour les résidus 9 à 19 présentant un R_2 élevé dans MeOH mais pas dans H₂O.

De manière similaire, les régions de MccJ25 ne présentent pas de dynamique différente entre elles. Leur paramètre d'ordre moyen est identique à celui de MccJ25 dans son entier (environ 0,5). En revanche, dans H₂O, on remarque que la boucle possède un $\langle S^2 \rangle$ plus faible (0,60 à 298 K) que celui du cycle (0,79) et de la queue (0,73). Le $\langle S^2 \rangle$ de la boucle subit aussi un effet de température puisqu'il diminue de 0,70 à 0,48 lorsque la température augmente. La boucle aurait des mouvements de plus grande amplitude que la partie cycle/C-ter, qui impose au peptide dans son entier ses mouvements, et serait plus sensible aux effets de température.

La représentation de chaque résidu sur la structure tridimensionnelle de MccJ25 selon leur paramètre d'ordre dans MeOH (Figure 71) et H₂O (Figure 72) permet de rendre compte de manière plus visuelle des différences entre les différentes régions de MccJ25. On constate ainsi que les résidus de la partie C-terminale présentent moins de mobilité interne que ceux situés en amont dans la séquence et constituant la boucle. Curieusement, les résidus du cycle ne semblent pas se comporter de manière homogène. On peut ainsi noter que les résidus His5, Val6 et Glu8 possèdent des paramètres d'ordre sensiblement plus élevés que les autres résidus du cycle. De même pour les résidus de la boucle, les résidus Val11 à Thr15 possèdent une mobilité plus ample que les résidus Phe9 et Tyr10 qui, sans doute à cause de leur proximité avec la liaison lactame, sont plus « rigides ».

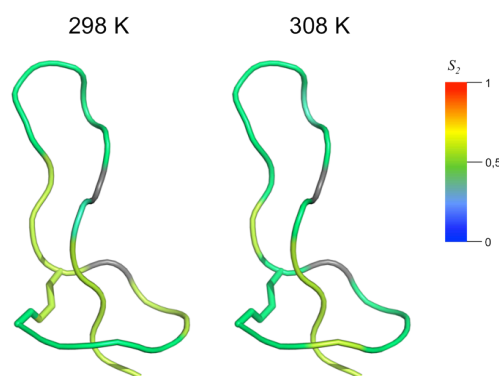


Figure 71 : Représentation des résidus de MccJ25 selon leur paramètre d'ordre S^2 dans MeOH à 298 K (gauche) et à 308 K (droite). Les données utilisées ont été enregistrées à 700 MHz.



Figure 72 : Représentation des résidus de MccJ25 selon leur paramètre d'ordre S^2 dans H₂O de 288 K (gauche) à 308 K (droite). Les données utilisées ont été enregistrées à 950 MHz.

MccJ25, bien que très compacte et remarquablement stable face à l'action protéolytique ou à la dégradation chimique, n'est donc pas aussi homogène sur le plan dynamique que nous aurions pu le supposer. Sa structure verrouillée ne permet pas à ses résidus de présenter des différences de dynamique importantes les uns par rapport aux autres, mais nous pouvons dégager quelques résultats notables.

- (i) La dynamique du peptide est sensible au solvant. Dans H₂O, les deux conformations sont en échange lent et son paramètre d'ordre est très supérieur à celui qu'il possède dans MeOH. H₂O établirait sans doute des liaisons hydrogène avec MccJ25, ce qui aurait pour effet de stabiliser le peptide vis-à-vis des mouvements rapides.
- (ii) Les résidus de la boucle présentent un paramètre d'ordre plus faible que le reste du peptide dans l'eau.
- (iii) Les résidus de la partie C-terminale piégés dans le cycle présentent un paramètre d'ordre élevé cohérent avec une certaine rigidité structurale.

II. Dichroïsme circulaire de peptides lasso

L'analyse par CD de peptides lasso a été effectuée pour la svcéucine (peptide lasso de type I), MccJ25 et la capistruine (peptides lasso de type II). Afin de dégager de ces expériences les paramètres structuraux de la topologie lasso qui sont responsables d'un signal CD particulier, nous avons analysé en parallèle les spectres des topoisomères de synthèse cycliques branchés MccJ25-lcm et capistruine-lcm, des variants de MccJ25 qui étaient en lasso (H5K et H5R) ou cyclique branché (insA5-6) et de deux formes de la svcéucine réduite puis alkylée.

Compte-tenu de la difficulté de solubiliser les peptides cycliques branchés dans H₂O et des résultats identiques obtenus dans ce solvant pour les peptides lasso, nous avons choisi de travailler dans MeOH-H₂O 1:1 (v/v).

II.1. Comparaison des signaux CD de peptides lasso

L'étude par CD de la svcéucine, de MccJ25 et de la capistruine dans MeOH-H₂O 1:1 (v/v) a révélé la présence d'un maximum positif à 226 nm pour la svcéucine et à 218 nm pour MccJ25 qui n'est pas présent sur le spectre de la capistruine (Figure 73A). Par ailleurs, les topoisomères de synthèse MccJ25-lcm et capistruine-lcm présentent un signal typique d'un peptide structuré de manière irrégulière.

La capistruine et la capistruine-lcm présentent quelques différences avec les peptides ci-dessus. Si la capistruine-lcm présente comme attendu le spectre d'un peptide structuré aléatoirement, la capistruine ne présente pas la bande positive observée chez MccJ25 et la svcéucine.

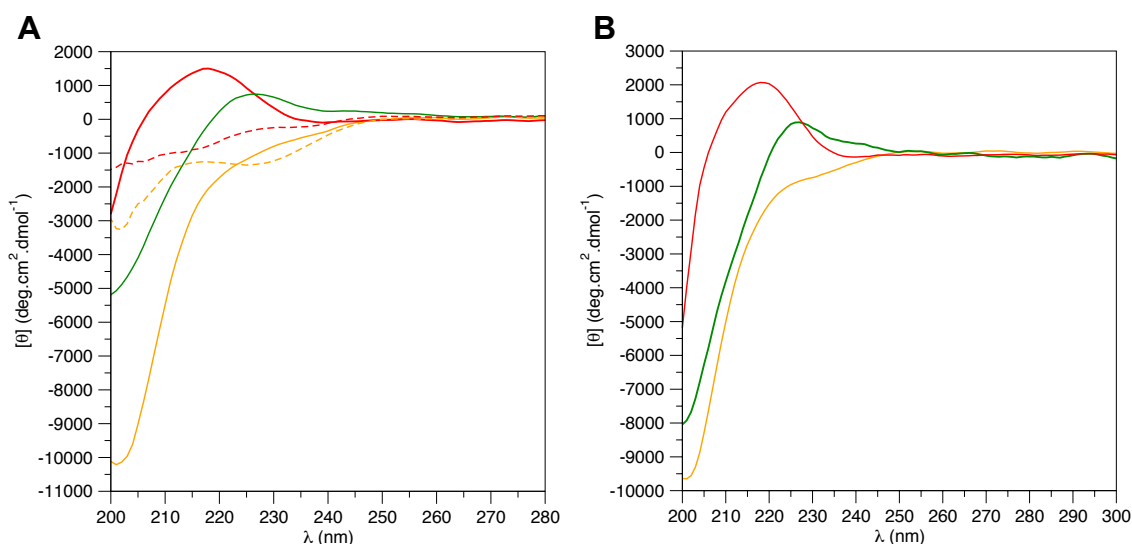


Figure 73 : A) Spectres CD de peptides lasso et de leurs topoisomères cycliques branchés dans MeOH-H₂O 1:1 v/v. Rouge : MccJ25 (ligne pleine) et MccJ25-lcm (tirets) ; vert : svcécucine (ligne pleine) ; orange : capistruine (ligne pleine) et capistruine-lcm (tirets). **B) Spectres CD de peptides lasso dans H₂O.** Rouge : MccJ25 ; vert : svcécucine ; orange : capistruine.

Afin de vérifier les effets de solvant sur les spectres des trois peptides lasso, nous avons aussi enregistré les spectres de MccJ25, de la svcécucine et de la capistruine dans H₂O. Les spectres CD obtenus étaient identiques à ceux obtenus dans MeOH-H₂O (Figure 73B).

II.2. Dichroïsme circulaire de MccJ25 et de ses variants

Les spectres de MccJ25 et de ses variants montrent des résultats similaires. Les variants MccJ25[H5K] et MccJ25[H5R], structurés en lasso et actifs biologiquement sur les mêmes souches bactériennes que MccJ25 (données non montrées), possèdent un spectre identique à MccJ25, indiquant que la substitution d'un résidu du cycle ne change pas la structure responsable de la bande positive (Figure 74). En revanche, le variant MccJ25[insA5-6], que nous avons identifié comme n'étant pas structuré en lasso (voir Chapitre II), présente un spectre identique à celui de MccJ25-lcm, c'est-à-dire celui d'un peptide déstructuré.

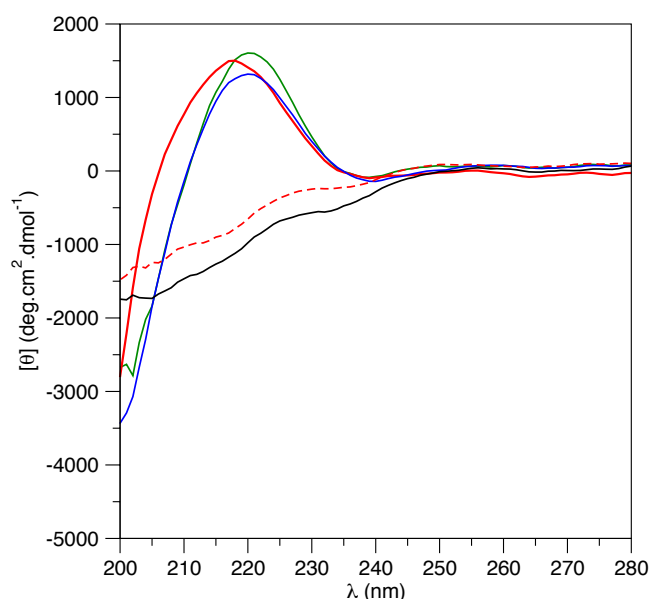


Figure 74 : Spectres CD de MccJ25 et de ses variants dans MeOH-H₂O 1:1 v/v. Rouge : MccJ25 (ligne pleine) et MccJ25-lcm (tirets) ; vert : MccJ25[H5K] ; bleu : MccJ25[H5R] ; noir : MccJ25[insA5-6].

Ces résultats indiquent que la bande positive n'est pas affectée par une substitution de l'histidine His5 dans le cycle macrolactame, mais en revanche que son existence nécessite que la partie C-terminale soit piégée. Ceci suggère que cette signature est caractéristique de la topologie lasso de MccJ25.

II.3. Dichroïsme circulaire de la svicéucine et de ses formes réduites et alkylées

La svicéucine possède deux ponts disulfure entre les résidus Cys1/Cys13 et Cys7/Cys19. Nous avons réduit la svicéucine et alkylé les cystéines. La réduction à 95 °C fait apparaître deux formes réduites de la svicéucine, une majoritaire qui existe aussi après réduction à 37 °C et une minoritaire (voir Annexe 5).

Les spectres CD de ces peptides (Figure 75) montrent que le spectre de la forme majoritaire possède la même bande positive à 228 nm que la svicéucine native. En revanche, la forme minoritaire présente le spectre d'un peptide structuré de manière irrégulière

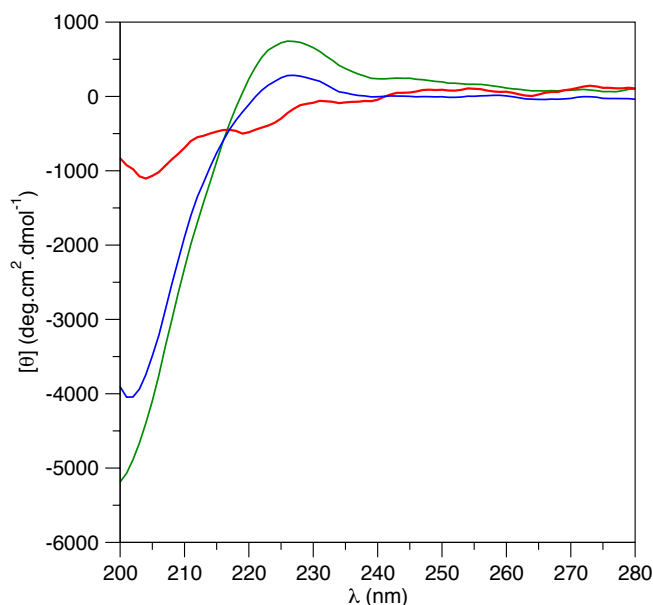


Figure 75 : Spectres CD de la svicécucine et de ses formes réduites dans MeOH-H₂O 1:1 v/v. Vert : svicécucine ; bleu : forme réduite et alkylée majoritaire de la svicécucine ; rouge : forme réduite et alkylée minoritaire de la svicécucine.

II.4. Interprétation des résultats

MccJ25 et la svicécucine présentent une bande positive autour de 220 nm. Ce signal est proche de celui des hélices 3_{10} ou poly-Pro type II. Les hélices 3_{10} sont des hélices dans lesquelles les liaisons hydrogène sont établies entre les résidus n et $n+3$, le tour étant formé par 10 atomes. Les hélices poly-Pro de type II correspondent le plus souvent à un squelette peptidique présentant les angles dièdres ϕ d'un « β -turn ». Les résidus impliqués dans cette structure possèdent des angles ϕ et ψ autour de -75° et -145° respectivement²⁷⁹. La boucle en épingle à cheveux β de MccJ25 et de la svicécucine se rapproche structuralement de ce genre de structures secondaires, ce qui explique le spectre CD de ces deux peptides. En revanche, le spectre de la capistruline ne possède pas ce maximum caractéristique.

La boucle de MccJ25 possède 10 résidus, celle de la svicécucine 5 et celle de la capistruline 3. Par ailleurs, MccJ25 présente un rapprochement stérique de deux résidus aromatiques Phe19 et Tyr20 de part et d'autre du cycle macrolactame. La svicécucine possède un résidu Trp17 sous le cycle. Le signal CD de ces peptides peut ainsi être dû à la forme de leur boucle ou à la présence de résidus aromatiques proches du cycle.

Par ailleurs, l'étude des spectres CD des formes réduites de la svicécucine

montre des résultats différents. La réduction suivie d'alkylation à 37 °C de la svicéucine ne donne qu'une seule forme réduite de la svicéucine. La même expérience réalisée à 95 °C donne deux formes de la svicéucine réduite-alkylée qui présentent des spectres CD différents. La forme majoritaire possède la bande positive à 228 nm de la svicéucine alors que la forme minoritaire présente le signal d'un peptide structuré irrégulièrement. Ceci suggère que la réduction-alkylation de la svicéucine à 95 °C donne une forme structurée en lasso et dont la topologie est maintenue par les contraintes stériques des groupements alkyle des cystéines, et une deuxième forme cyclique branchée dont la queue C-terminale a pu « s'échapper » du cycle avant la réaction d'alkylation.

Conclusion

Les peptides lasso, bien qu'étant des structures peptidiques relativement petites, possèdent cependant des régions structurales déterminées et nécessaires à leurs activités biologiques et dont les caractéristiques peuvent être étudiées par des méthodes spectroscopiques comme la relaxation ^{15}N par RMN ou le CD.

La RMN et le CD sont deux méthodes spectroscopiques puissantes et précises pour déterminer la conformation des protéines et des peptides. Appliquées aux peptides lasso, ces méthodes nous ont renseignés un peu plus sur les régions structurales qui constituent la topologie lasso.

L'étude de la dynamique interne de MccJ25 par relaxation ^{15}N nous a ainsi appris que les deux régions impliquées dans des étapes différentes de son mécanisme d'action (boucle et cycle/C-terminal), n'étaient pas homogènes sur le plan de la mobilité des résidus. Les résidus constituant la partie C-terminale sont bel et bien piégés par le cycle et les contraintes stériques des résidus aromatiques Phe19 et Tyr 20. Cependant, les résidus du cycle macrolactame que nous aurions pu penser être eux aussi rigidifiés par la présence des résidus aromatiques ne présentent pas un comportement homogène. Par ailleurs, la dynamique de MccJ25 semble sensible aux effets de solvant puisque dans un solvant organique (MeOH), elle présente une mobilité interne globale accentuée, ce qui se traduit par une diminution du paramètre d'ordre de ses résidus, ainsi qu'une atténuation des différences de dynamique entre ses acides aminés.

En outre, la région structurale des peptides lasso composée par la boucle en

épingle à cheveux β présente un spectre CD particulier, typique d'un « β -turn », avec un maximum positif aux alentours de 215-230 nm. Nous faisons l'hypothèse que ce signal peut être dû à la boucle des peptides lasso ou à la présence de résidus aromatiques près du cycle macrolactame. Le peptide RES-701-1 possède lui aussi un tel spectre et sa séquence est riche en résidus aromatiques. De plus, sa structure lasso est stabilisée par deux résidus Tyr situés de part et d'autre du cycle macrolactame.

Néanmoins, si la présence de ce signal est due à la boucle du peptide, il nécessite alors un nombre d'acides aminés minimum impliqués dans la boucle puisque la capistruine, dont la boucle n'est formée que de 3 résidus, ne présente pas un tel spectre.

Discussion générale – conclusions et perspectives

MccJ25 est un archétype des peptides lasso produit par *E. coli*, dont le système génétique est porté par un plasmide. Cette caractéristique facilite les manipulations génétiques pour l'étude de la biosynthèse, des relations structure/activité et la bio-ingénierie. Ainsi, MccJ25 est le peptide lasso le mieux connu en termes de mécanismes de biosynthèse^{167–169,171,280}. Les travaux de Sophie Duquesne et de Kok-Phen Yan, qui ont réalisé leurs thèses au laboratoire respectivement en 2007 et 2011, ont permis de caractériser *in vitro* la maturation du précurseur McjA en présence des enzymes de maturation McjB et McjC, et de définir l'activité propre de chaque enzyme (protéase à cystéine ATP-dépendante et lactame synthétase) et leur interdépendance. Le mécanisme d'action de MccJ25 est aussi particulièrement étudié, et on connaît avec plus de précision les étapes (i) d'import, impliquant les protéines FhuA de la membrane externe²⁰⁶ et SbmA de la membrane interne¹⁸³ et (ii) de toxicité intracellulaire, principalement via une inhibition de l'ARNpol^{189,207}. Des études structure/activité ont permis de dégager le rôle de deux régions structurales dans ces deux étapes : la boucle en épingle à cheveux β est nécessaire pour l'interaction de MccJ25 avec FhuA²⁰⁰, tandis que le cycle macrolactame et la queue C-terminale dépassant sous le cycle interagissent avec l'ARNpol¹⁹⁵. Des substitutions d'acides aminés de MccJ25 par mutagenèse dirigée ont permis, (i) par une approche systématique, de définir les positions tolérantes aux substitutions¹⁹⁷, et (ii) par une substitution multiple, d'obtenir des variants ayant une activité accrue²⁰³. Enfin, MccJ25 est le premier peptide sur lequel a été faite la preuve de concept de l'utilisation de la structure lasso pour la conception de peptides bioactifs, avec le développement d'un antagoniste de l'intégrine en introduisant la séquence RGD au sommet de la boucle²¹⁴.

Notre étude structure/activité de MccJ25, présentée dans le **chapitre II** et publiée dans la revue *ChemBioChem* en 2012, vient compléter les travaux précédents avec une approche visant à examiner la tolérance de la machinerie aux insertions et délétions dans le cycle macrolactame et la queue C-terminale, et à identifier les éléments clés pour le maintien de la topologie en lasso. Elle s'appuie

pour la première fois sur une caractérisation de la topologie des variants générés, par LC-MS/MS et digestion par la carboxypeptidase Y et pour certains par RMN. L'examen de l'activité antibactérienne sur une souche du genre *Salmonella* très sensible à MccJ25 a permis de dégager l'influence de la topologie et des insertions, délétions, substitutions introduites sur les variants. Les résidus situés sous le cycle (Tyr20, Gly21) et la taille du cycle sont critiques pour la topologie et l'activité antibactérienne, tandis que la réduction de la taille de la boucle Tyr9-Ser18 au-dessus du cycle ou l'allongement de la queue C-terminale Tyr20-Gly21 sous le cycle ne perturbent pas la topologie en lasso, mais ont des effets sur l'activité, allant de la réduction à la suppression.

La connaissance des mécanismes de biosynthèse, d'action et des relations structure/activité des peptides lasso s'enrichit avec le nombre de représentants de cette famille. L'exploration de génome *in silico* est une méthode de criblage efficace de nouveaux peptides, comme en témoigne l'accélération récente des publications dans ce domaine^{135,154,155,167,281,282}. Le **chapitre III** présente la caractérisation structurale d'un nouveau peptide lasso, la svicéucine, qui a été prédit grâce à cette méthode. La svicéucine est un peptide lasso de type I qui ne partage que 45 % d'identité de séquence avec les autres peptides de cette classe, alors que ceux-ci présentent plus de 90 % d'identité entre eux. Elle présente un cycle et une boucle de même taille que les autres peptides lasso de type I, et le même appariement des ponts disulfure, mais est plus courte d'un acide aminé. Ce nouveau représentant des peptides lasso de type I augmente donc la diversité de cette famille au niveau des séquences en acides aminés et de la taille de la queue C-terminale dépassant sous le cycle macrolactame. Toutefois, le type I reste la classe la plus conservée au niveau des séquences en acides aminés et de la taille de la boucle par rapport au type II, ce qui suggère une moins grande tolérance de la machinerie de biosynthèse aux substitutions ou aux modifications de la taille de la boucle pour cette classe. La séquence du seul peptide lasso de type III, BI-32169, qui ne possède qu'un pont disulfure Cys6/Cys19, suggère que la suppression du pont Cys1/Cys13 permettrait de conserver la topologie lasso. La svicéucine présente une activité antibactérienne similaire à celle décrites pour des peptides lasso de type I¹³⁹, et une répartition des résidus hydrophobes et polaires proche de celle de RP-71955¹⁴⁸, un représentant de

la famille. Dans ce cas, la boucle de la svicéucine pourrait alors être sujette à un certain nombre de modifications, toujours dans une perspective de bio-ingénierie.

L'analyse structurale des peptides lasso est typiquement menée par RMN (pour revue²³⁴). La spectrométrie de masse apparaît également comme un outil puissant pour caractériser leur topologie, puisque dans certains cas la structure lasso est associée à une signature particulière comme (i) des ions fragments bipeptidiques dans des expériences MS/MS, (ii) un profil de transfert de H[•] particulier dans des expériences de dissociation induites par capture d'électron et/ou (iii) une cinétique de dissociation particulière^{235,283}. Toutefois, la potentialité des méthodes spectroscopiques pour la caractérisation structurale et dynamique n'a pas été exploitée au maximum. La RMN offre non seulement la possibilité de déterminer la structure tridimensionnelle de ces peptides, mais également de caractériser leur dynamique interne, ce qui pourrait permettre de mieux comprendre leurs interactions avec des cibles protéiques. Les peptides lasso sont considérés comme très rigides du fait de leur topologie bloquée, mais aucune donnée expérimentale ne vient appuyer cette hypothèse. De plus, MccJ25 présente une boucle longue par rapport aux autres peptides lasso, qui pourrait conférer une certaine flexibilité à sa structure. Par ailleurs, le CD, qui permet d'étudier globalement la conformation, a montré pour le peptide RES-701-1 (peptide lasso type II) une bande positive autour de 230 nm, absente du spectre du peptide linéaire²³², mais ce signal particulier n'a pas été recherché pour d'autres peptides lasso. Ces observations nous ont amenés à mener (i) une étude de la dynamique de MccJ25 par RMN, et (ii) une étude par CD de différents peptides lasso et de variants lasso ou cycliques branchés, dont les résultats sont rassemblés au **chapitre IV**.

L'analyse de la dynamique de MccJ25 par relaxation de spin ¹⁵N montre que le peptide ne présente pas une mobilité interne homogène. MccJ25 est globalement très ordonnée dans l'eau, quelle que soit la température d'étude, mais présente une mobilité plus importante dans le méthanol. Par ailleurs, certains résidus proches des zones « frontières » entre le cycle macrolactame associé à la queue C-terminale et la boucle présentent dans l'eau un paramètre d'ordre plus faible que les autres résidus.

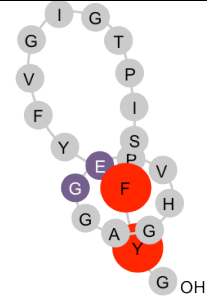
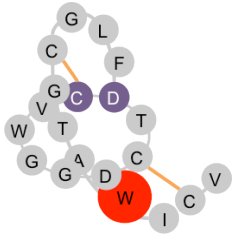
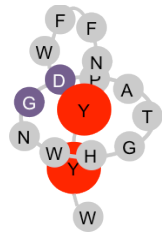
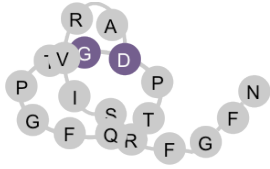
Ces résultats confirment que les deux régions de MccJ25 sont relativement indépendantes sur le plan de la dynamique du peptide. Ces résultats pourraient être complétés par une étude de dynamique de MccJ25 en interaction avec une cible protéique. De plus, Ewen Lescop, avec qui j'ai mené cette étude, a réalisé une étude de la dynamique interne du précurseur McjA, qui sera par la suite complétée par une étude en présence d'un complexe lasso-synthétase enzymatiquement inactif. La confrontation de la dynamique interne du précurseur linéaire McjA, seul ou en interaction avec les enzymes de maturation, et du peptide lasso mature MccJ25 pourrait permettre de caractériser la dynamique de la mise en forme de la structure lasso au cours de la maturation.

L'étude par CD de différents peptides lasso a révélé, pour MccJ25 (peptide lasso de type II) et la svicéucine (peptide lasso type I), une bande positive similaire à celle décrite pour RES-701-1, respectivement à 217 nm et 228 nm. L'analyse de variants lasso ou cycliques branchés de MccJ25 et de la svicéucine a révélé que cette bande est spécifique de la topologie lasso. Cependant, cette bande n'a pas été observée pour la capistruine (peptide lasso de type II). Au vu des séquences en acides aminés et des structures tridimensionnelles des trois peptides (Tableau 24), on peut proposer que la différence de spectres CD observée pour MccJ25 et la svicéucine d'une part, et la capistruine d'autre part, résulterait (i) d'une différence de la taille de la boucle des peptides et/ou (ii) de la présence/absence de résidus aromatiques à proximité du cycle macrolactame.

Pour répondre à cette question, on peut envisager d'étudier des variants de MccJ25 modifiés (i) au niveau de la taille de la boucle (forme clivée entre Phe10 et Val11 par la thermolysine, constituée de deux peptides associés¹⁷⁹, variants de boucle plus courte comme MccJ25[ΔG12-G14]²⁸⁴...) ou (ii) au niveau du profil de résidus aromatiques (MccJ25 avec des substitutions supprimant un à un les résidus aromatiques, comme MccJ25[Y20I]). On pourra également construire des variants de la capistruine comportant des résidus aromatiques, en collaboration avec l'équipe du Pr. Marahiel²¹⁶ en Allemagne. De plus, l'analyse du précurseur McjA par CD et le suivi de l'apparition de cette bande pourrait permettre de suivre la mise en forme du peptide en présence d'un complexe lasso-synthétase enzymatiquement inactif¹⁷¹.

Enfin, si le rôle des résidus aromatiques dans cette signature de CD est confirmé, on pourra également explorer les potentialités de la fluorescence du tryptophane ou de la tyrosine pour caractériser la topologie lasso, toujours dans l'optique à plus long terme de suivre la mise en forme du précurseur au cours de la maturation.

Tableau 24 : Séquence, nombre de résidus constituant la boucle et nature des résidus aromatiques à proximité directe du cycle macrolactame des peptides caractérisés par CD. Les résidus du cycle sont représentés en vert dans la séquence. Les résidus formant la liaison lactame sont représentés en violet dans les schémas, les résidus aromatiques de part et d'autre du cycle en rouge et les ponts disulfure en orange. Les schémas ont été réalisés à partir des structures résolues par RMN^{145,150,154}.

Peptides	Séquence	Boucle	Résidus aromatiques
MccJ25	GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG	10	
svicéucine	CVWGGDCTDFLGCGTAWICV	5	
RES-701-1	GNWHGTAPDWFFNYYW	4	
capistruline	GTPGFQTPDARVISRFGFN	3	

La capistruline et MccJ25, qui exercent une activité antibactérienne sur des bactéries à Gram négatif, inhibent toutes deux l'ARNpol^{189,207,285}. En revanche, les peptides lasso de type I possèdent une activité antibactérienne sur les bactéries à Gram positif¹³⁹. Une hypothèse sur cette différence d'activité est que les peptides lasso antibactériens pourraient avoir en commun cette cible intracellulaire, mais que

le spectre d'activité serait conditionné par l'étape d'import du peptide. Un des objectifs de l'équipe afin de vérifier cette hypothèse est donc de mettre en place un test d'activité d'inhibition de l'ARNpol par fluorescence, afin d'examiner l'activité de la svicéucine et de variants de MccJ25 sur cette protéine.

Bibliographie

- (1) Mishra, B.; Tiwari, V. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 4769–4807.
- (2) Lee, K.-H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 500–516.
- (3) Arnison, P.; Bibb, M.; Bierbaum, G.; Bowers, A.; Bulaj, G.; Camarero, J.; Campopiano, D.; Clardy, J.; Cotter, P.; Craik, D.; Dittman, E.; Donadio, S.; Dorrestein, P.; Entian, K.-D.; Fischbach, M.; Göransson, U.; Gruber, C.; Haft, D.; Hemscheidt, T.; Hertweck, C.; Hill, C.; Horswill, A.; Jaspars, M.; Kelly, W.; Klinman, J.; Kuipers, O.; Link, J.; Liu, W.; Marahiel, M.; Mitchell, D.; Moll, G.; Moore, B.; Nes, I.; Norris, G.; Olivera, B.; Onaka, H.; Patchett, M.; Reaney, M.; Rebuffat, S.; Ross, P.; Sahl, H.-G.; Schmidt, E.; Selsted, M.; Severinov, K.; Shen, B.; Sivonev, K.; Smith, L.; Stein, T.; Vederas, J.; Walsh, C.; Walton, J.; Willey, J. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products. **en rédaction**.
- (4) Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 710–720.
- (5) Gruber, C.; Elliott, A.; Ireland, D.; Delprete, P.; Dessein, S.; Göransson, U.; Trabi, M.; Wang, C.; Kinghorn, A.; Robbrecht, E.; Craik, D. Distribution and evolution of circular miniproteins in flowering plants. *Plant Cell* **2008**, *20*, 2471–2483.
- (6) Daly, N.; Rosengren, J.; Craik, D. Discovery, structure and biological activities of cyclotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 918–930.
- (7) Terlau, H.; Olivera, B. *Conus* venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev.* **2004**, *84*, 41–68.
- (8) Cotter, P.; Hill, C.; Ross, P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 777–788.
- (9) Duquesne, S.; Petit, V.; Peduzzi, J.; Rebuffat, S. Structural and functional diversity of microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *13*, 200–209.
- (10) Maksimov, M.; Pan, S.; Link, J. Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. *Nat. Prod. Rep.* **2012**.
- (11) Craik, D.; Allewell, N. Thematic minireview series on circular proteins. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 26999–27000.
- (12) Tam, J.; Wong, C. Chemical synthesis of circular proteins. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27020–27025.
- (13) Aboye, T.; Camarero, J. Biological synthesis of circular polypeptides. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27026–27032.
- (14) Lehrer, R.; Cole, A.; Selsted, M. θ -defensins: cyclic peptides with endless potential. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27014–27019.
- (15) Tang, Y.-Q.; Yuan, J.; Miller, C.; Selsted, M. Isolation, characterization, cDNA cloning, and antimicrobial properties of two distinct subfamilies of α -defensins from rhesus macaque leukocytes. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 6139–6144.
- (16) Tang, Y.-Q.; Yuan, J.; Ösapay, G.; Ösapay, K.; Tran, D.; Miller, C.; Ouellette, A.; Selsted, M. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. *Science* **1999**, *286*, 498–502.
- (17) Cole, A.; Hong, T.; Boo, L.; Nguyen, T.; Zhao, C.; Bristol, G.; Zack, J.; Waring, A.; Yang, O.; Lehrer, R. Retrocyclin: a primate peptide that protects cells from infection by T- and M-tropic strains of HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 1813–1818.
- (18) Tang, M.; Waring, A.; Lehrer, R.; Hong, M. Orientation of a β -hairpin antimicrobial peptide in lipid bilayers from two-dimensional dipolar chemical-shift correlation NMR. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 3616–3624.

- (19) Trabi, M.; Schirra, H.; Craik, D. Three-dimensional structure of RTD-1, a cyclic antimicrobial defensin from Rhesus macaque leukocytes. *Biochemistry* **2001**, *40*, 4211–4221.
- (20) Daly, N.; Chen, Y.-K.; Rosengren, J.; Marx, U.; Phillips, M.; Waring, A.; Wang, W.; Lehrer, R.; Craik, D. Retrocyclin-2: structural analysis of a potent anti-HIV θ -defensin. *Biochemistry* **2007**, *46*, 9920–9928.
- (21) Wang, W.; Owen, S.; Rudolph, D.; Cole, A.; Hong, T.; Waring, A.; Lal, R.; Lehrer, R. Activity of α - and θ -defensins against primary isolates of HIV-1. *J. Immunol.* **2004**, *173*, 515–520.
- (22) Liang, Q.-I.; Zhou, K.; He, H.-X. Retrocyclin 2: a new therapy against avian influenza H5N1 virus *in vivo* and *in vitro*. *Biotechnol. Lett.* **2010**, *32*, 387–392.
- (23) Yasin, B.; Wang, W.; Pang, M.; Cheshenko, N.; Hong, T.; Waring, A.; Herold, B.; Wagar, E.; Lehrer, R. θ -defensins protect cells from infection by *Herpes simplex* virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J. Virol.* **2004**, *78*, 5147–5156.
- (24) Göransson, U.; Burman, R.; Gunasekera, S.; Strömstedt, A.; Rosengren, J. Circular proteins from plants and fungi. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27001–27006.
- (25) Craik, D.; Daly, N.; Bond, T.; Waite, C. Plant cyclotides: a unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 1327–1336.
- (26) Craik, D.; Anderson, M.; Barry, D.; Clark, R.; Daly, N.; Jennings, C.; Mulvenna, J. Discovery and structures of the cyclotides: novel macrocyclic peptides from plants. *Lett. Pept. Sci.* **2001**, *8*, 119–128.
- (27) Gran, L. Isolation of oxytocic peptides from *Oldenlandia affinis* by solvent extraction of tetraphenylborate complexes and chromatography on sephadex LH-20. *Lloydia* **1973**, *36*, 207–208.
- (28) Gran, L. On the effect of a polypeptide isolated from “kalata-kalata” (*Oldenlandia affinis* DC) on the oestrogen dominated uterus. *Acta Pharmacol. Tox.* **1973**, *33*, 400–408.
- (29) Saether, O.; Craik, D.; Campbell, I.; Sletten, K.; Juul, J.; Norman, D. Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry* **1995**, *34*, 4147–4158.
- (30) Daly, N.; Craik, D. Bioactive cystine knot proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 362–368.
- (31) Daly, N.; Rosengren, J.; Troeira Henriques, S.; Craik, D. NMR and protein structure in drug design: application to cyclotides and conotoxins. *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40*, 359–370.
- (32) Jennings, C.; Rosengren, J.; Daly, N.; Plan, M.; Stevens, J.; Scanlon, M.; Waite, C.; Norman, D.; Anderson, M.; Craik, D. Isolation, solution structure, and insecticidal activity of kalata B2, a circular protein with a twist: do Möbius strips exist in nature? *Biochemistry* **2005**, *44*, 851–860.
- (33) Shinkarev, Z.; Nadezhdin, K.; Lyukmanova, E.; Sobol, V.; Skjeldal, L.; Arseniev, A. Divalent cation coordination and mode of membrane interaction in cyclotides: NMR spatial structure of ternary complex kalata B7/Mn²⁺/DPC micelle. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1246–1256.
- (34) Wang, C.; Hu, S.-H.; Martin, J.; Sjögren, T.; Hajdu, J.; Bohlin, L.; Claeson, P.; Göransson, U.; Rosengren, J.; Tang, J.; Tan, N.-H.; Craik, D. Combined X-Ray and NMR analysis of the stability of the cyclotide cystine knot fold that underpins its insecticidal activity and potential use as a drug scaffold. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 10672–10683.
- (35) Ireland, D.; Colgrave, M.; Craik, D. A novel suite of cyclotides from *Viola odorata*: sequence variation and the implications for structure, function and stability. *Biochem. J.* **2006**, *400*, 1–12.
- (36) Daly, N.; Clark, R.; Plan, M.; Craik, D. Kalata B8, a novel antiviral circular protein, exhibits conformational flexibility in the cystine knot motif. *Biochem. J.* **2006**, *393*, 619–626.

- (37) Mulvenna, J.; Sando, L.; Craik, D. Processing of a 22 kDa precursor protein to produce the circular protein tricyclon A. *Structure* **2005**, *13*, 691–701.
- (38) Rosengren, J.; Daly, N.; Plan, M.; Waine, C.; Craik, D. Twists, knots, and rings in proteins. Structural definition of the cyclotide framework. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8606–8616.
- (39) Svängård, E.; Göransson, U.; Smith, D.; Verma, C.; Backlund, A.; Bohlin, L.; Claeson, P. Primary and 3-D modelled structures of two cyclotides from *Viola odorata*. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 135–142.
- (40) Chen, B.; Colgrave, M.; Daly, N.; Rosengren, J.; Gustafson, K.; Craik, D. Isolation and characterization of novel cyclotides from *Viola hederaceae*: solution structure and anti-HIV activity of vhl-1, a leaf-specific expressed cyclotide. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 22395–22405.
- (41) Trabi, M.; Craik, D. Tissue-specific expression of head-to-tail cyclized miniproteins in *Violaceae* and structure determination of the root cyclotide *Viola hederacea* root cyclotide 1. *Plant Cell* **2004**, *16*, 2204–2216.
- (42) Daly, N.; Koltay, A.; Gustafson, K.; Boyd, M.; Casas-Finet, J.; Craik, D. Solution structure by NMR of circulin A: a macrocyclic knotted peptide having anti-HIV activity. *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 333–345.
- (43) Koltay, A.; Daly, N.; Gustafson, K.; Craik, D. Structure of circulin B and implications for antimicrobial activity of the cyclotides. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2005**, *11*, 99–106.
- (44) Barry, D.; Daly, N.; Bokesch, H.; Gustafson, K.; Craik, D. Solution structure of the cyclotide palicourein: implications for the development of a pharmaceutical framework. *Structure* **2004**, *12*, 85–94.
- (45) Felizmenio-Quimio, M.; Daly, N.; Craik, D. Circular proteins in plants: solution structure of a novel macrocyclic trypsin inhibitor from *Momordica cochinchinensis*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22875–22882.
- (46) Gustafson, K.; Walton, L.; Sowder, R.; Johnson, D.; Pannell, L.; Cardellina, J.; Boyd, M. New circulin macrocyclic polypeptides from *Chassalia parvifolia*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 176–178.
- (47) Tam, J.; Lu, Y.; Yang, J.; Chiu, K. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 8913–8918.
- (48) Jennings, C.; West, J.; Waine, C.; Craik, D.; Anderson, M. Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 10614–10619.
- (49) Plan, M.; Saska, I.; Cagauan, A.; Craik, D. Backbone cyclised peptides from plants show molluscicidal activity against the rice pest *Pomacea canaliculata* (golden apple snail). *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5237–5241.
- (50) Colgrave, M.; Kotze, A.; Huang, Y.-H.; O'Grady, J.; Simonsen, S.; Craik, D. Cyclotides: natural, circular plant peptides that possess significant activity against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Biochemistry* **2008**, *47*, 5581–5589.
- (51) Colgrave, M.; Kotze, A.; Kopp, S.; McCarthy, J.; Coleman, G.; Craik, D. Anthelmintic activity of cyclotides: in vitro studies with canine and human hookworms. *Acta Trop.* **2009**, *109*, 163–166.
- (52) Barbeta, B.; Marshall, A.; Gillon, A.; Craik, D.; Anderson, M. Plant cyclotides disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 1221–1225.
- (53) Colgrave, M.; Craik, D. Thermal, chemical, and enzymatic stability of the cyclotide kalata B1: the importance of the cyclic cystine knot. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5965–5975.
- (54) Gunasekera, S.; Foley, F.; Clark, R.; Sando, L.; Fabri, L.; Craik, D.; Daly, N. Engineering stabilized vascular endothelial growth factor-A antagonists: synthesis, structural characterization, and bioactivity of grafted analogues of cyclotides. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 7697–7704.
- (55) McIntosh, J.; Santos, A.; Olivera, B. *Conus* peptides targeted to specific nicotinic

- acetylcholine receptor subtypes. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 59–88.
- (56) Bingham, J.-P.; Mitsunaga, E.; Bergeron, Z. Drugs from slugs. Past, present and future perspectives of ω -conotoxin research. *Chem.-Biol. Interact.* **2010**, *183*, 1–18.
 - (57) McIntosh, J.; Yoshikami, D.; Mahe, E.; Nielsen, D.; Rivier, J.; Gray, W.; Olivera, B. A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity, α -conotoxin Iml. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 16733–16739.
 - (58) French, R.; Prusak-Sochaczewski, E.; Zamponi, G.; Becker, S.; Kularatna, A.; Horn, R. Interactions between a pore-blocking peptide and the voltage sensor of the sodium channel: an electrostatic approach to channel geometry. *Neuron* **1996**, *16*, 407–413.
 - (59) Nadasdi, L.; Yamashiro, D.; Chung, D.; Tarczy-Hornoch, K.; Adriaenssens, P.; Ramachandran, J. Structure-activity analysis of a *Conus* peptide blocker of N-type neuronal calcium channels. *Biochemistry* **1995**, *34*, 8076–8081.
 - (60) Doyle, D.; Morais Cabral, J.; Pfuetzner, R.; Kuo, A.; Gulbis, J.; Cohen, S.; Chait, B.; MacKinnon, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **1998**, *280*, 69–77.
 - (61) Terlau, H.; Boccaccio, A.; Olivera, B.; Conti, F. The block of Shaker K⁺ channels by κ -conotoxin PVIIA is state dependent. *J. Gen. Physiol.* **1999**, *114*, 125–140.
 - (62) Miljanich, G. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 3029–3040.
 - (63) Cartier, G.; Yoshikami, D.; Gray, W.; Luo, S.; Olivera, B.; McIntosh, J. A new α -conotoxin which targets $\alpha_3\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 7522–7528.
 - (64) Ellison, M.; Feng, Z.-P.; Park, A.; Zhang, X.; Olivera, B.; McIntosh, J.; Norton, R. α -RgIA, a novel conotoxin that blocks the $\alpha_9\alpha_{10}$ nAChR: structure and identification of key receptor binding residues. *J. Mol. Biol.* **2008**, *377*, 1216–1227.
 - (65) Clark, R.; Fischer, H.; Nevin, S.; Adams, D.; Craik, D. The synthesis, structural characterization, and receptor specificity of the α -conotoxin Vc1.1. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 23254–23263.
 - (66) Imperial, J.; Bansal, P.; Alewood, P.; Daly, N.; Craik, D.; Sporning, A.; Terlau, H.; López-Vera, E.; Bandyopadhyay, P.; Olivera, B. A novel conotoxin inhibitor of Kv1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8331–8340.
 - (67) Hillyard, D.; Olivera, B.; Woodward, S.; Corpuz, G.; Gray, W.; Ramilo, C.; Cruz, L. A molluscivorous *Conus* toxin: conserved frameworks in conotoxins. *Biochemistry* **1989**, *28*, 358–361.
 - (68) Shon, K.; Stocker, M.; Terlau, H.; Stühmer, W.; Jacobsen, R.; Walker, C.; Grilley, M.; Watkins, M.; Hillyard, D.; Gray, W.; Olivera, B. κ -Conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the shaker K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33–38.
 - (69) Sato, S.; Nakamura, H.; Ohizumi, Y.; Kobayashi, J.; Hirata, Y. The amino acid sequences of homologous hydroxyproline-containing myotoxins from the marine snail *Conus geographus* venom. *FEBS Lett.* **1983**, *155*, 277–280.
 - (70) Shon, K.; Olivera, B.; Watkins, M.; Jacobsen, R.; Gray, W.; Floresca, C.; Cruz, L.; Hillyard, D.; Brink, A.; Terlau, H.; Yoshikami, D. μ -conotoxin PIIIA, a new peptide for discriminating among tetrodotoxin-sensitive Na channel subtypes. *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 4473–4481.
 - (71) Nakao, M.; Nishiuchi, Y.; Nakata, M.; Watanabe, T.; Kimura, T.; Sakakibara, S. Synthesis and disulfide structure determination of conotoxin GS, a γ -carboxyglutamic acid-containing neurotoxic peptide. *Lett. Pept. Sci.* **1995**, *2*, 17–26.
 - (72) McIntosh, J.; Hasson, A.; Spira, M.; Gray, W.; Li, W.; Marsh, M.; Hillyard, D.; Olivera, B. A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 16796–16802.
 - (73) Olivera, B.; McIntosh, J.; Cruz, L.; Luque, F.; Gray, W. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* **1984**, *23*, 5087–5090.

- (74) Olivera, B.; Cruz, L. Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* **2001**, *39*, 7–14.
- (75) Hillyard, D.; Monje, V.; Mintz, I.; Bean, B.; Nadasdi, L.; Ramachandran, J.; Miljanich, G.; Azimi-Zoonooz, A.; McIntosh, J.; Cruz, L. A new *Conus* peptide ligand for mammalian presynaptic Ca²⁺ channels. *Neuron* **1992**, *9*, 69–77.
- (76) Kohno, T.; Sasaki, T.; Kobayashi, K.; Fainzilber, M.; Sato, K. Three-dimensional solution structure of the sodium channel agonist/antagonist δ -conotoxin TxVIA. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 36387–36391.
- (77) Scanlon, M.; Naranjo, D.; Thomas, L.; Alewood, P.; Lewis, R.; Craik, D. Solution structure and proposed binding mechanism of a novel potassium channel toxin κ -conotoxin PVIIA. *Structure* **1997**, *5*, 1585–1597.
- (78) Hill, J.; Alewood, P.; Craik, D. Three-dimensional solution structure of μ -conotoxin GIIIB, a specific blocker of skeletal muscle sodium channels. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8824–8835.
- (79) Daly, N. L.; Ekberg, J. A.; Thomas, L.; Adams, D. J.; Lewis, R. J.; Craik, D. J. Structures of μ O-conotoxins from *Conus marmoreus*. Inhibitors of tetrodotoxin (TTX)-sensitive and TTX-resistant sodium channels in mammalian sensory neurons. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25774–25782.
- (80) Farr-Jones, S.; Miljanich, G.; Nadasdi, L.; Ramachandran, J.; Basus, V. Solution structure of ω -conotoxin MVIIC, a high affinity ligand of P-type calcium channels, using ¹H NMR spectroscopy and complete relaxation matrix analysis. *J. Mol. Biol.* **1995**, *248*, 106–124.
- (81) Jack, R.; Tagg, J.; Ray, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*, 171–200.
- (82) Riley, M.; Wertz, J. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* **2002**, *84*, 357–364.
- (83) Schnell, N.; Entian, K.-D.; Schneider, U.; Götz, F.; Zühner, H.; Kellner, R.; Jung, G. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature* **1988**, *333*, 276–278.
- (84) Chatterjee, C.; Paul, M.; Xie, L.; van der Donk, W. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 633–684.
- (85) Willey, J.; van der Donk, W. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* **2007**, *61*, 477–501.
- (86) Rogers, L. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* **1928**, *16*, 321–325.
- (87) Chatterjee, C.; Miller, L.; Leung, Y.; Xie, L.; Yi, M.; Kelleher, N.; van der Donk, W. Lactacin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15332–15333.
- (88) Cotter, P.; O'Connor, P.; Draper, L.; Lawton, E.; Deegan, L.; Hill, C.; Ross, P. Post-translational conversion of L-serines to D-alanines is vital for optimal production and activity of the lantibiotic lactacin 3147. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 18584–18589.
- (89) Miller, L.; Chatterjee, C.; van der Donk, W.; Kelleher, N. The dehydratase activity of lactacin 481 synthetase is highly processive. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1420–1421.
- (90) Xie, L.; Miller, L.; Chatterjee, C.; Averin, O.; Kelleher, N.; van der Donk, W. Lactacin 481: *in vitro* reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science* **2004**, *303*, 679–681.
- (91) Oman, T.; van der Donk, W. Follow the leader: the use of leader peptides to guide natural product biosynthesis. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *6*, 9–18.
- (92) Li, B.; Yu, J.; Brunzelle, J.; Moll, G.; van der Donk, W.; Nair, S. Structure and mechanism of the lantibiotic cyclase involved in nisin biosynthesis. *Science* **2006**, *311*, 1464–1467.
- (93) Stein, T.; Heinzmann, S.; Solovieva, I.; Entian, K.-D. Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisl* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 89–94.

- (94) Hoffmann, A.; Schneider, T.; Pag, U.; Sahl, H.-G. Localization and functional analysis of Pepl, the immunity peptide of Pep5-producing *Staphylococcus epidermidis* strain 5. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3263–3271.
- (95) Gross, E.; Morell, J. Structure of nisin. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 4634–4635.
- (96) Gross, E.; Kiltz, H.; Nebelin, E. The structure of subtilin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1973**, *354*, 810–812.
- (97) Allgaier, H.; Jung, G.; Werner, R.; Schneider, U.; Zähler, H. Elucidation of the structure of epidermin, a ribosomally synthesized, tetracyclic heterodetic polypeptide antibiotic. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *24*, 1051–1053.
- (98) Kellner, R.; Jung, G.; Josten, M.; Kaletta, C.; Entian, K.-D.; Sahl, H.-G. Pep5: strukturaufklärung eines großen lantibioticums. *Angew. Chem.* **2006**, *101*, 618–621.
- (99) Kessler, H.; Steuernagel, S.; Will, M.; Jung, G.; Kellner, R.; Gillessen, D.; Kamiyama, T. The structure of the polycyclic nonadecapeptide RO-09-0198. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 1924–1929.
- (100) van den Hooven, H.; Lagerwerf, F.; Heerma, W.; Haverkamp, J.; Piard, J.-C.; Hilbers, C.; Siezen, R.; Kuipers, O.; Rollema, H. The structure of the lantibiotic lactacin 481 produced by *Lactococcus lactis*: location of the thioether bridges. *FEBS Lett.* **1996**, *391*, 317–322.
- (101) Chatterjee, S.; Phansalkar, M.; Rupp, R.; Ganguli, B.; Fehlhaber, H.; Kogler, H. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 832–838.
- (102) Skaugen, M.; Nissen-Meyer, J.; Jung, G.; Stevanovic, S.; Sletten, K.; Inger, C.; Abildgaard, M.; Nes, I. F. *In vivo* conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 27183–27185.
- (103) Paik, S.; Chakicherla, A.; Hansen, N. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 23134–23142.
- (104) Martin, N.; Sprules, T.; Carpenter, M.; Cotter, P.; Hill, C.; Ross, P.; Vederas, J. Structural characterization of lactacin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity. *Biochemistry* **2004**, *43*, 3049–3056.
- (105) McClerren, A.; Cooper, L.; Quan, C.; Thomas, P.; Kelleher, N.; van der Donk, W. Discovery and *in vitro* biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 17243–17248.
- (106) Kodani, S.; Hudson, M.; Durrant, M.; Buttner, M.; Nodwell, J.; Willey, J. The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 11448–11453.
- (107) Kodani, S.; Lodato, M.; Durrant, M.; Picart, F.; Willey, J. SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the *Streptomyces*. *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 1368–1380.
- (108) Hsu, S.-T.; Breukink, E.; Tischenko, E.; Lutters, M.; de Kruijff, B.; Kaptein, R.; Bonvin, A.; van Nuland, N. The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 963–967.
- (109) Hsu, S.-T.; Breukink, E.; Bierbaum, G.; Sahl, H.-G.; de Kruijff, B.; Kaptein, R.; van Nuland, N.; Bonvin, A. NMR study of mersacidin and lipid II interaction in dodecylphosphocholine micelles. Conformational changes are a key to antimicrobial activity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13110–13117.
- (110) Breukink, E.; Wiedemann, I.; van Kraaij, C.; Kuipers, O.; Sahl, H.; de Kruijff, B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* **1999**, *286*, 2361–2364.
- (111) Hasper, H.; de Kruijff, B.; Breukink, E. Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry* **2004**, *43*, 11567–11575.
- (112) Wiedemann, I.; Benz, R.; Sahl, H.-G. Lipid II-mediated pore formation by the peptide antibiotic nisin: a black lipid membrane study. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 3259–3261.

- (113) Hasper, H.; Kramer, N.; Smith, J.; Hillman, J.; Zachariah, C.; Kuipers, O.; de Kruijff, B.; Breukink, E. An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science* **2006**, *313*, 1636–1637.
- (114) Dufour, A.; Hindré, T.; Haras, D.; Le Pennec, J.-P. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiol. Rev.* **2007**, *31*, 134–167.
- (115) Brötz, H.; Bierbaum, G.; Reynolds, P.; Sahl, H. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 193–199.
- (116) Makino, A.; Baba, T.; Fujimoto, K.; Iwamoto, K.; Yano, Y.; Terada, N.; Ohno, S.; Sato, S.; Ohta, A.; Umeda, M.; Matsuzaki, K.; Kobayashi, T. Cinnamycin (RO-09-0198) promotes cell binding and toxicity by inducing transbilayer lipid movement. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 3204–3209.
- (117) Ueda, K.; Oinuma, K.-I.; Ikeda, G.; Hosono, K.; Ohnishi, Y.; Horinouchi, S.; Beppu, T. AmfS, an extracellular peptidic morphogen in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 1488–1492.
- (118) Willey, J.; Willems, A.; Kodani, S.; Nodwell, J. Morphogenetic surfactants and their role in the formation of aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **2006**, *59*, 731–742.
- (119) Kemperman, R.; Kuipers, A.; Karsens, H.; Nauta, A.; Kuipers, O.; Kok, J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 1589–1597.
- (120) Montalbán-López, M.; Sánchez-Hidalgo, M.; Cebrián, R.; Maqueda, M. Discovering the bacterial circular proteins: bacteriocins, cyanobactins, and pilins. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 27007–27013.
- (121) Maqueda, M.; Sánchez-Hidalgo, M.; Fernández, M.; Montalbán-López, M.; Valdivia, E.; Martínez-Bueno, M. Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 2–22.
- (122) Martínez-Bueno, M.; Maqueda, M.; Gálvez, A.; Samyn, B.; van Beeumen, J.; Coyette, J.; Valdivia, E. Determination of the gene sequence and the molecular structure of the enterococcal peptide antibiotic AS-48. *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 6334–6339.
- (123) Kawai, Y.; Saito, T.; Kitazawa, H.; Itoh, T. Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci. Biotech. Bioch.* **1998**, *62*, 2438–2440.
- (124) Toba, T.; Samant, S.; Yoshioka, E.; Itoh, T. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. *Lett. Appl. Microbiol.* **1991**, *13*, 281–286.
- (125) Leer, R.; van der Vossen, J.; van Giezen, M.; van Noort, J.; Pouwels, P. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* **1995**, *141*, 1629–1635.
- (126) Kalmokoff, M.; Teather, R. Isolation and characterization of a bacteriocin (butyrivibriocin AR10) from the ruminal anaerobe *Butyrivibrio fibrisolvens* AR10: evidence in support of the widespread occurrence of bacteriocin-like activity among ruminal isolates of *B. fibrisolvens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, *63*, 394–402.
- (127) Wirawan, R.; Swanson, K.; Kleffmann, T.; Jack, R.; Tagg, J. Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology* **2007**, *153*, 1619–1630.
- (128) Kawulka, K.; Sprules, T.; Diaper, C.; Whittall, R.; McKay, R.; Mercier, P.; Zuber, P.; Vederas, J. Structure of subtilisin A, a cyclic antimicrobial peptide from *Bacillus subtilis* with unusual disulfide to α -carbon cross-links: formation and reduction of α -thio- α -amino acid derivatives. *Biochemistry* **2004**, *43*, 3385–3395.
- (129) Martin-Visscher, L.; van Belkum, M.; Garneau-Tsodikova, S.; Whittall, R.; Zheng, J.; McMullen, L.; Vederas, J. Isolation and characterization of carnocyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 4756–4763.
- (130) Sawa, N.; Zendo, T.; Kiyofuji, J.; Fujita, K.; Himeno, K.; Nakayama, J.; Sonomoto, K. Identification and characterization of lactocyclin Q, a novel cyclic bacteriocin

- produced by *Lactococcus* sp. strain QU 12. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 1552–1558.
- (131) Martin-Visscher, L.; Gong, X.; Duszyk, M.; Vederas, J. The three-dimensional structure of carnocyclin A reveals that many circular bacteriocins share a common structural motif. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 28674–28681.
 - (132) Sánchez-Barrena, M.; Martínez-Ripoll, M.; Gálvez, A.; Valdivia, E.; Maqueda, M.; Cruz, V.; Albert, A. Structure of bacteriocin AS-48: from soluble state to membrane bound state. *J. Mol. Biol.* **2003**, *334*, 541–549.
 - (133) Rosengren, J.; Craik, D. How bugs make lassos. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1211–1212.
 - (134) Weber, W.; Fischli, W.; Hochuli, E.; Kupfer, E.; Weibel, E. Anantin - a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). I - Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 164–171.
 - (135) Maksimov, M.; Pelczer, I.; Link, J. Precursor-centric genome-mining approach for lasso peptide discovery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**.
 - (136) Salomón, R.; Farías, R. Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1992**, *174*, 7428–7435.
 - (137) Helynck, G.; Dubertret, C.; Mayaux, J.-F.; Leboul, J. Isolation of RP 71955, a new anti-HIV-1 peptide secondary metabolite. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1756–1757.
 - (138) Helynck, G. Nouveaux polypeptides biologiquement actifs, préparation et utilisation **1994**.
 - (139) Tsunakawa, M.; Hu, S.; Hoshino, Y.; Detlefson, D.; Hill, S.; Furumai, T.; White, R.; Nishio, M.; Kawano, K.; Yamamoto, S. Siamycins I and II, new anti-HIV peptides. I - Fermentation, isolation, biological activity and initial characterization. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 433–434.
 - (140) Morishita, Y.; Chiba, S.; Tsukuda, E.; Tanaka, T.; Ogawa, T.; Yamasaki, M.; Yoshida, M.; Kawamoto, I.; Matsuda, Y. RES-701-1, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. RE-701. I - Characterization of producing strain, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 269–275.
 - (141) Ogawa, T.; Ochiai, K.; Tanaka, T.; Tsukuda, E.; Chiba, S.; Yano, K.; Yamasaki, M.; Yoshida, M.; Matsuda, Y. RES-701-2, -3 and -4, novel and selective endothelin type B receptor antagonists produced by *Streptomyces* sp. I - Taxonomy of producing strains, fermentation, isolation, and biochemical properties. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1213–1220.
 - (142) Kimura, K.-I.; Kanou, F.; Takahashi, H.; Esumi, Y.; Uramoto, M.; Yoshihama, M. Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Microbispora*. I - Fermentation, isolation and biological properties. *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 373–378.
 - (143) Blond, A.; Péduzzi, J.; Goulard, C.; Chiuchiolo, M.; Barthélémy, M.; Prigent, Y.; Salomón, R.; Farías, R.; Moreno, F.; Rebuffat, S. The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259*, 747–756.
 - (144) Blond, A.; Cheminant, M.; Ségalas-Milazzo, I.; Péduzzi, J.; Barthélémy, M.; Goulard, C.; Salomón, R.; Moreno, F.; Farías, R.; Rebuffat, S. Solution structure of microcin J25, the single macrocyclic antimicrobial peptide from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2124–2133.
 - (145) Rosengren, J.; Clark, R.; Daly, N.; Göransson, U.; Jones, A.; Craik, D. Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12464–12474.
 - (146) Bayro, M.; Mukhopadhyay, J.; Swapna, G.; Huang, J.; Ma, L.-C.; Sineva, E.; Dawson, P.; Montelione, G.; Ebright, R. Structure of antibacterial peptide microcin J25: a 21-residue lariat protoknot. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12382–12383.
 - (147) Wilson, K.-A.; Kalkum, M.; Ottesen, J.; Yuzenkova, J.; Chait, B.; Landick, R.; Muir, T.; Severinov, K.; Darst, S. Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12475–12483.
 - (148) Frechet, D.; Guitton, J.; Herman, F.; Faucher, D.; Helynck, G.; Monegier du Sorbier,

- B.; Ridoux, J.; James-Surcouf, E.; Vuilhorgne, M. Solution structure of RP 71955, a new 21 amino acid tricyclic peptide active against HIV-1 virus. *Biochemistry* **1994**, *33*, 42–50.
- (149) Katahira, R.; Yamasaki, M.; Matsuda, Y.; Yoshida, M. MS-271, a novel inhibitor of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces* sp. II - Solution structure of MS-271: characteristic features of the “lasso” structure. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 121–129.
- (150) Katahira, R.; Shibata, K.; Yamasaki, M.; Matsuda, Y.; Yoshida, M. Solution structure of endothelin B receptor selective antagonist RES-701-1 determined by ¹H NMR spectroscopy. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1273–1280.
- (151) Potterat, O.; Wagner, K.; Gemmecker, G.; Mack, J.; Puder, C.; Vettermann, R.; Streicher, R. BI-32169, a bicyclic 19-peptide with strong glucagon receptor antagonist activity from *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1528–1531.
- (152) Knappe, T.; Linne, U.; Xie, X.; Marahiel, M. The glucagon receptor antagonist BI-32169 constitutes a new class of lasso peptides. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 785–789.
- (153) Iwatsuki, M.; Tomoda, H.; Uchida, R.; Gouda, H.; Hirono, S.; Ōmura, S. Lariatins, antimycobacterial peptides produced by *Rhodococcus* sp. K01-B0171, have a lasso structure. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7486–7491.
- (154) Knappe, T.; Linne, U.; Zirah, S.; Rebuffat, S.; Xie, X.; Marahiel, M. Isolation and structural characterization of capistruiin, a lasso peptide predicted from the genome sequence of *Burkholderia thailandensis* E264. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11446–11454.
- (155) Kersten, R.; Yang, Y.-L.; Xu, Y.; Cimermancic, P.; Nam, S.-J.; Fenical, W.; Fischbach, M.; Moore, B.; Dorrestein, P. A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 794–802.
- (156) Rebuffat, S.; Blond, A.; Destoumieux-Garzón, D.; Goulard, C.; Peduzzi, J. Microcin J25, from the macrocyclic to the lasso structure: implications for biosynthetic, evolutionary and biotechnological perspectives. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2004**, *5*, 383–391.
- (157) Vincent, P.; Morero, R. The structure and biological aspects of peptide microcin J25. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 538–549.
- (158) Portrait, V.; Gendron-Gaillard, S.; Cottenceau, G.; Pons, A. Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Can. J. Microbiol.* **1999**, *45*, 988–994.
- (159) Vincent, P.; Delgado, M.; Farías, R.; Salomón, R. Inhibition of *Salmonella enterica* serovars by microcin J25. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *236*, 103–107.
- (160) Chokekijchai, S.; Kojima, E.; Anderson, S.; Nomizu, M.; Tanaka, M.; Machida, M.; Date, T.; Toyota, K.; Ishida, S.; Watanabe, K. NP-06: a novel anti-human immunodeficiency virus polypeptide produced by a *Streptomyces* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2345–2347.
- (161) Detlefsen, D.; Hill, S.; Volk, K.; Klohr, S.; Tsunakawa, M.; Furumai, T.; Lin, P.; Nishio, M.; Kawano, K.; Oki, T.; Lee, M. Siamycins I and II, new anti-HIV-1 peptides. II - Sequence analysis and structure determination of siamycin I. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 1515–1517.
- (162) Yano, K.; Toki, S.; Nakanishi, S.; Ochiai, K.; Ando, K.; Yoshida, M.; Matsuda, Y.; Yamasaki, M. MS-271, a novel inhibitor of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces* sp. I - isolation, structural determination and biological properties of MS-271. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 115–120.
- (163) Constantine, K.; Friedrichs, M.; Detlefsen, D.; Nishio, M.; Tsunakawa, M.; Furumai, T.; Ohkuma, H.; Oki, T.; Hill, S.; Brucoleri, R.; Lin, P.-F.; Mueller, L. High-resolution solution structure of siamycin II: novel amphipathic character of a 21-residue peptide that inhibits HIV fusion. *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 271–286.
- (164) Iwatsuki, M.; Uchida, R.; Takakusagi, Y.; Matsumoto, A.; Jiang, C.-L.; Takahashi, Y.; Arai, M.; Kobayashi, S.; Matsumoto, M.; Inokoshi, J.; Tomoda, H.; Ōmura, S.

- Lariatins, novel antimycobacterial peptides with a lasso structure, produced by *Rhodococcus jostii* K01-B0171. *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 357–363.
- (165) Solbiati, J.; Ciaccio, M.; Farías, R.; Salomón, R. Genetic analysis of plasmid determinants for microcin J25 production and immunity. *J. Bacteriol.* **1996**, *178*, 3661–3663.
 - (166) Solbiati, J.; Ciaccio, M.; Farías, R.; González-Pastor, J.; Moreno, F.; Salomón, R. Sequence analysis of the four plasmid genes required to produce the circular peptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 2659–2662.
 - (167) Duquesne, S.; Destoumieux-Garzón, D.; Zirah, S.; Goulard, C.; Peduzzi, J.; Rebuffat, S. Two enzymes catalyze the maturation of a lasso peptide in *Escherichia coli*. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 793–803.
 - (168) Clarke, D.; Campopiano, D. Maturation of McjA precursor peptide into active microcin MccJ25. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2564–2566.
 - (169) Cheung, W.; Pan, S.; Link, J. Much of the microcin J25 leader peptide is dispensable. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2514–2155.
 - (170) Pan, S.; Rajniak, J.; Cheung, W.; Link, J. Construction of a single polypeptide that matures and exports the lasso peptide microcin J25. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 367–370.
 - (171) Yan, K.-P.; Li, Y.; Zirah, S.; Goulard, C.; Knappe, T.; Marahiel, M.; Rebuffat, S. Dissecting the maturation steps of the lasso peptide microcin J25 *in vitro*. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1046–1052.
 - (172) Chiuchiolo, M.; Delgado, M.; Farías, R.; Salomón, R. Growth-phase-dependent expression of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1755–1764.
 - (173) Salomón, R.; Farías, R. Influence of iron on microcin 25 production. *FEMS Microbiol. Lett.* **1994**, *121*, 275–279.
 - (174) Pan, S.; Cheung, W.; Link, J. Engineered gene clusters for the production of the antimicrobial peptide microcin J25. *Protein Expr. Purif.* **2010**, *71*, 200–206.
 - (175) Delgado, M. A.; Solbiati, J. O.; Chiuchiolo, M. J.; Farías, R. N.; Salomón, R. A. *Escherichia coli* outer membrane protein TolC is involved in production of the peptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 1968–1970.
 - (176) Koronakis, V.; Sharff, A.; Koronakis, E.; Luisi, B.; Hughes, C. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **2000**, *405*, 914–919.
 - (177) Delgado, M.; Vincent, P.; Farías, R.; Salomón, R. Yojl of *Escherichia coli* functions as a microcin J25 efflux pump. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 3465–3470.
 - (178) Blond, A.; Cheminant, M.; Destoumieux-Garzón, D.; Ségalas-Milazzo, I.; Peduzzi, J.; Goulard, C.; Rebuffat, S. Thermolysin-linearized microcin J25 retains the structured core of the native macrocyclic peptide and displays antimicrobial activity. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 6212–6222.
 - (179) Rosengren, J.; Blond, A.; Afonso, C.; Tabet, J.-C.; Rebuffat, S.; Craik, D. Structure of thermolysin cleaved microcin J25: extreme stability of a two-chain antimicrobial peptide devoid of covalent links. *Biochemistry* **2004**, *43*, 4696–4702.
 - (180) Salomón, R.; Farías, R. The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 7741–7742.
 - (181) Wayne, R.; Frick, K.; Neilands, J. Siderophore protection against colicins M, B, V, and Ia in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **1976**, *126*, 7–12.
 - (182) Locher, K.; Rees, B.; Koebnik, R.; Mitschler, A.; Moulinier, L.; Rosenbusch, J.; Moras, D. Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor. *Cell* **1998**, *95*, 771–778.
 - (183) Salomón, R.; Farías, R. The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 3323–3325.
 - (184) Laviña, M.; Pugsley, A.; Moreno, F. Identification, mapping, cloning and characterization of a gene (*sbmA*) required for microcin B17 action on *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **1986**, *132*, 1685–1693.

- (185) Mattiuzzo, M.; Bandiera, A.; Gennaro, R.; Benincasa, M.; Pacor, S.; Antcheva, N.; Scocchi, M. Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Mol. Microbiol.* **2007**, *66*, 151–163.
- (186) Yeaman, M.; Yount, N. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 27–55.
- (187) Rintoul, M.; de Arcuri, B.; Morero, R. Effects of the antibiotic peptide microcin J25 on liposomes: role of acyl chain length and negatively charged phospholipid. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1509*, 65–72.
- (188) Rintoul, M.; de Arcuri, B.; Salomón, R.; Farías, R.; Morero, R. The antibacterial action of microcin J25: evidence for disruption of cytoplasmic membrane energization in *Salmonella* newport. *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *204*, 265–270.
- (189) Delgado, M.; Rintoul, M.; Farías, R.; Salomón, R. *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 4543–4550.
- (190) Bellomio, A.; Vincent, P.; De Arcuri, B.; Farías, R.; Morero, R. Microcin J25 has dual and independent mechanisms of action in *Escherichia coli*: RNA polymerase inhibition and increased superoxide production. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 4180–4186.
- (191) Niklison-Chirou, M.; Bellomio, A.; Dupuy, F.; Arcuri, B.; Minahk, C.; Morero, R. Microcin J25 induces the opening of the mitochondrial transition pore and cytochrome *c* release through superoxide generation. *FEBS J.* **2008**, *275*, 4088–4096.
- (192) Niklison-Chirou, M.; Dupuy, F.; Pena, L.; Gallego, S.; Barreiro-Arcos, M.; Avila, C.; Torres-Bugeau, C.; Arcuri, B.; Bellomio, A.; Minahk, C.; Morero, R. Microcin J25 triggers cytochrome *c* release through irreversible damage of mitochondrial proteins and lipids. *Int. J. Biochem. Cell B.* **2010**, *42*, 273–281.
- (193) Bellomio, A.; Rintoul, M.; Morero, R. Chemical modification of microcin J25 with diethylpyrocarbonate and carbodiimide: evidence for essential histidyl and carboxyl residues. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2003**, *303*, 458–462.
- (194) Semenova, E.; Yuzenkova, Y.; Peduzzi, J.; Rebuffat, S.; Severinov, K. Structure-activity analysis of microcin J25: distinct parts of the threaded lasso molecule are responsible for interaction with bacterial RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 3859–3863.
- (195) Vincent, P.; Bellomio, A.; de Arcuri, B.; Farías, R.; Morero, R. MccJ25 C-terminal is involved in RNA-polymerase inhibition but not in respiration inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2005**, *331*, 549–551.
- (196) De Cristóbal, R.; Solbiati, J.; Zenoff, A.; Vincent, P.; Salomón, R.; Yuzenkova, J.; Severinov, K.; Farías, R. Microcin J25 uptake: His5 of the MccJ25 lariat ring is involved in interaction with the inner membrane MccJ25 transporter protein SbmA. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 3324–3328.
- (197) Pavlova, O.; Mukhopadhyay, J.; Sineva, E.; Ebricht, R.; Severinov, K. Systematic structure-activity analysis of microcin J25. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 25589–25595.
- (198) Chalon, M.; Bellomio, A.; Solbiati, J.; Morero, R.; Farias, R.; Vincent, P. Tyrosine 9 is the key amino acid in microcin J25 superoxide overproduction. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *300*, 90–96.
- (199) Dupuy, F.; Niklison-Chirou, M.; de Arcuri, B.; Minahk, C.; Morero, R. Proton motive force dissipation precludes interaction of microcin J25 with RNA polymerase, but enhances reactive oxygen species overproduction. *BBA-Gen. Subjects* **2009**, *1790*, 1307–1313.
- (200) Socias, S.; Severinov, K.; Salomon, R. The Ile13 residue of microcin J25 is essential for recognition by the receptor FhuA, but not by the inner membrane transporter SbmA. *FEMS Microbiol. Lett.* **2009**, *301*, 124–129.
- (201) Chalon, M.; Wilke, N.; Pedersen, J.; Rufini, S.; Morero, R.; Cortez, L.; Chehin, R.; Farias, R.; Vincent, P. Redox-active tyrosine residue in the microcin J25 molecule. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2011**, *406*, 366–370.

- (202) Dupuy, F.; Morero, R. Microcin J25 membrane interaction: selectivity toward gel phase. *BBA-Biomembranes* **2011**, *1808*, 1764–1771.
- (203) Pan, S.; Link, J. Sequence diversity in the lasso peptide framework: discovery of functional microcin J25 variants with multiple amino acid substitutions. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5016–5023.
- (204) Niklison-Chirou, M.; Dupuy, F.; Saavedra, L.; Hebert, E.; Banchio, C.; Minahk, C.; Morero, R. Microcin J25-Ga induces apoptosis in mammalian cells by inhibiting mitochondrial RNA-polymerase. *Peptides* **2011**, *32*, 832–834.
- (205) Bellomio, A.; Vincent, P.; de Arcuri, B.; Salomón, R.; Morero, R.; Farías, R. The microcin J25 β -hairpin region is important for antibiotic uptake but not for RNA polymerase and respiration inhibition. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2004**, *325*, 1454–1458.
- (206) Destoumieux-Garzón, D.; Duquesne, S.; Peduzzi, J.; Goulard, C.; Desmadril, M.; Letellier, L.; Rebuffat, S.; Boulanger, P. The iron–siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11–Pro16 β -hairpin region in the recognition mechanism. *Biochem. J.* **2005**, *389*, 869.
- (207) Mukhopadhyay, J.; Sineva, E.; Knight, J.; Levy, R.; Ebright, R. Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel. *Mol. Cell* **2004**, *14*, 739–751.
- (208) Adelman, K.; Yuzenkova, J.; La Porta, A.; Zenkin, N.; Lee, J.; Lis, J.; Borukhov, S.; Wang, M.; Severinov, K. Molecular mechanism of transcription inhibition by peptide antibiotic Microcin J25. *Mol. Cell* **2004**, *14*, 753–762.
- (209) Yuzenkova, J.; Delgado, M.; Nechaev, S.; Savalia, D.; Epshtein, V.; Artsimovitch, I.; Mooney, R.; Landick, R.; Farias, R.; Salomon, R.; Severinov, K. Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin J25. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 50867–50875.
- (210) Vassilyev, D.; Sekine, S.-I.; Laptenko, O.; Lee, J.; Vassilyeva, M.; Borukhov, S.; Yokoyama, S. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* **2002**, *417*, 712–719.
- (211) Sable, S.; Pons, A.; Gendron-Gaillard, S.; Cottenceau, G. Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 4595–4597.
- (212) Pomares, M. F.; Delgado, M. A.; Corbalan, N. S.; Farias, R. N.; Vincent, P. A. Sensitization of microcin J25-resistant strains by a membrane-permeabilizing peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 6837–6842.
- (213) Lopez, F.; Vincent, P.; Zenoff, A.; Salomón, R.; Farías, R. Efficacy of microcin J25 in biomatrices and in a mouse model of *Salmonella* infection. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 676–680.
- (214) Knappe, T.; Manzenrieder, F.; Mas-Moruno, C.; Linne, U.; Sasse, F.; Kessler, H.; Xie, X.; Marahiel, M. Introducing lasso peptides as molecular scaffolds for drug design: engineering of an integrin antagonist. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8714–8717.
- (215) Soudy, R.; Wang, L.; Kaur, K. Synthetic peptides derived from the sequence of a lasso peptide microcin J25 show antibacterial activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1794–1800.
- (216) Knappe, T.; Linne, U.; Robbel, L.; Marahiel, M. Insights into the biosynthesis and stability of the lasso peptide capistrucin. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 1290–1298.
- (217) Tanaka, T.; Tsukuda, E.; Nozawa, M.; Nonaka, H.; Ohno, T.; Kase, H.; Yamada, K.; Matsuda, Y. RES-701-1, a novel, potent, endothelin type B receptor-selective antagonist of microbial origin. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 724–730.
- (218) He, J.; Cody, W.; Flynn, M.; Welch, K.; Reynolds, E.; Doherty, A. RES-701-1, synthesis and a reevaluation of its effects on the endothelin receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 621–626.
- (219) Katahira, R.; Shibata, K.; Yamasaki, M.; Matsuda, Y.; Yoshida, M. RES-701-1, comparative study of the synthetic and the microbial-origin compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1595–1600.

- (220) Shibata, K.; Yano, K.; Tanaka, T.; Matsuda, Y.; Yamasaki, M. Analogs of an endothelin antagonist RES-701-1: substitutions of C-terminal amino acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 775–778.
- (221) Shibata, K.; Yano, K.; Tanaka, T.; Matsuda, Y.; Yamasaki, M. C-terminal modifications of an endothelin antagonist RES-701-1: production of ET_A/ET_B dual selective analogs. *Lett. Pept. Sci.* **1997**, *4*, 167–170.
- (222) Suzawa, T.; Shibata, K.; Tanaka, T.; Matsuda, Y.; Yamasaki, M. RES-701-1/endothelin-1 hybrid peptide having a potent binding activity for type B receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1715–1720.
- (223) Shibata, K.; Suzawa, T.; Ohno, T.; Yamada, K.; Tanaka, T.; Tsukuda, E.; Matsuda, Y.; Yamasaki, M. Hybrid peptides constructed from RES-701-1, an endothelin B receptor antagonist, and endothelin; binding selectivity for endothelin receptors and their pharmacological activity. *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 2459–2467.
- (224) Sasaki, K.; Dockerill, S.; Adamiak, D.; Tickle, I.; Blundell, T. X-ray analysis of glucagon and its relationship to receptor binding. *Nature* **1975**, *257*, 751–757.
- (225) Iwatsuki, M.; Koizumi, Y.; Gouda, H.; Hirono, S.; Tomoda, H.; Ōmura, S. Lys17 in the “lasso” peptide lariat A is responsible for anti-mycobacterial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2888–2890.
- (226) Lin, P.; Samanta, H.; Bechtold, C.; Deminie, C.; Patick, A.; Alam, M.; Riccardi, K.; Rose, R.; White, R.; Colonna, R. Characterization of siamycin I, a human immunodeficiency virus fusion inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 133–138.
- (227) Ma, P.; Nishiguchi, K.; Yuille, H.; Davis, L.; Nakayama, J.; Phillips-Jones, M. Anti-HIV siamycin I directly inhibits autophosphorylation activity of the bacterial FsrC quorum sensor and other ATP-dependent enzyme activities. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 2660–2664.
- (228) Kimura, K.-I.; Yamazaki, M.; Sasaki, N.; Yamashita, T.; Negishi, S.; Nakamura, T.; Koshino, H. Novel propeptin analog, propeptin-2, missing two amino acid residues from the propeptin C-terminus loses antibiotic potency. *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 519–523.
- (229) Nar, H.; Schmid, A.; Puder, C.; Potterat, O. High-resolution crystal structure of a lasso peptide. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 1689–1692.
- (230) Wyss, D.; Lahm, H.; Manneberg, M.; Labhardt, A. Anantin - a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). II - Determination of the primary sequence by NMR on the basis of proton assignments. *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 172–180.
- (231) Vos, R.; Engelborghs, Y. A fluorescence study of tryptophan-histidine interactions in the peptide anantin and in solution. *Photochem. Photobiol.* **1994**, *60*, 24–32.
- (232) Yamasaki, M.; Yano, K.; Yoshida, M.; Matsuda, Y.; Yamaguchi, K. RES-701-1, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. RE-701. II - Determination of the primary sequence. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 276–280.
- (233) Esumi, Y.; Suzuki, Y.; Itoh, Y.; Uramoto, M.; Kimura, K.-I.; Goto, M.; Yoshihama, M.; Ichikawa, T. Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Microbispora*. II - Determination of chemical structure. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 296–300.
- (234) Xie, X.; Marahiel, M. NMR as an effective tool for the structure determination of lasso peptides. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 621–625.
- (235) Zirah, S.; Afonso, C.; Linne, U.; Knappe, T.; Marahiel, M.; Rebuffat, S.; Tabet, J.-C. Topoisomer differentiation of molecular knots by FTICR-MS: lessons from class II lasso peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* **2011**, *22*, 467–479.
- (236) Curtis, N.; Eisenstadt, R.; East, S.; Cornford, R.; Walker, L.; White, A. Iron-regulated outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12 and mechanism of action of catechol-substituted cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 1879–1886.
- (237) Gomez-Escribano, J.; Bibb, M. Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microbial Biot.* **2011**, *4*, 207–215.

- (238) Yan, K.-P. Molecular mechanisms governing the biosynthesis of lasso peptides, bioactive peptides produced by bacteria: the example of microcin J25, Université Paris VI, 2011.
- (239) Mak, A. S.; Jones, B. L. Application of S-pyridylethylation of cysteine to the sequence analysis of proteins. *Anal. Biochem.* **1978**, *84*, 432–440.
- (240) Kelly, S.; Jess, T.; Price, N. How to study proteins by circular dichroism. *BBA-Proteins Proteom.* **2005**, *1751*, 119–139.
- (241) Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenář, V. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661–665.
- (242) Hwang, T.; Shaka, A. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *J. Magn. Res. Ser. A* **1995**, *112*, 275–279.
- (243) Aue, W.; Bartholdi, E.; Ernst, R. Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229–2246.
- (244) Marion, D.; Wüthrich, K. Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1983**, *113*, 967–974.
- (245) Rance, M.; Sørensen, O.; Bodenhausen, G.; Wagner, G.; Ernst, R.; Wüthrich, K. Improved spectral resolution in COSY ^1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1983**, *117*, 479–485.
- (246) Braunschweiler, L.; Ernst, R. Coherence transfer by isotropic mixing: application to proton correlation spectroscopy. *J. Magn. Res.* **1983**, *53*, 521–528.
- (247) Bax, A.; Davis, D. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Res.* **1985**, *65*, 355–360.
- (248) Rance, M. Improved techniques for homonuclear rotating-frame and isotropic mixing experiments. *J. Magn. Res.* **1987**, *74*, 557–564.
- (249) Kumar, A.; Ernst, R.; Wüthrich, K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1980**, *95*, 1–6.
- (250) Bothner-By, A.; Stephens, R.; Lee, J.; Warren, C.; Jeanloz, R. Structure determination of a tetrasaccharide: transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 811–813.
- (251) Bodenhausen, G.; Ruben, D. Natural abundance ^{15}N NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **1980**, *69*, 185–189.
- (252) Bax, A.; Marion, D. Improved resolution and sensitivity in ^1H -detected heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy. *J. Magn. Res.* **1988**, *78*, 186–191.
- (253) Vranken, W.; Boucher, W.; Stevens, T.; Fogh, R.; Pajon, A.; Llinas, M.; Ulrich, E.; Markley, J.; Ionides, J.; Laue, E. The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Prot. Struct. Func. Bioinf.* **2005**, *59*, 687–696.
- (254) Wüthrich, K. *NMR of proteins and nucleic acids*; 1st ed.; Wiley-Interscience, 1986.
- (255) Brünger, A.; Clore, G.; Gronenborn, A.; Karplus, M. Solution conformations of human growth hormone releasing factor. Comparison of the restrained molecular dynamics and distance geometry methods for a system without long-range distance data. *Protein Eng.* **1987**, *1*, 399–406.
- (256) Brünger, A.; Kuriyan, J.; Karplus, M. Crystallographic R factor refinement by molecular dynamics. *Science* **1987**, *235*, 458–460.
- (257) Brünger, A. *X-PLOR version 3.1: a system for X-ray crystallography and NMR*; Yale University Press, 1993.
- (258) Brooks, B.; Bruccoleri, R.; Olafson, B.; States, D.; Swaminathan, S.; Karplus, M. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187–217.
- (259) Karplus, M. Contact electron-spin coupling of nuclear magnetic moments. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11–15.
- (260) Ramachandran, G.; Chandrasekaran, R. Conformational energy map of a dipeptide

- unit in relation to infrared and nuclear magnetic resonance data. *Biopolymers* **1971**, *10*, 935–939.
- (261) Bystrov, V. Spin-spin coupling and the conformational states of peptide systems. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **1976**, *10*, 41–82.
- (262) Pardi, A.; Billeter, M.; Wüthrich, K. Calibration of the angular dependence of the amide proton- C_α proton coupling constants, $^3J_{HN\alpha}$, in a globular protein: use of $^3J_{HN\alpha}$ for identification of helical secondary structure. *J. Mol. Biol.* **1984**, *180*, 741–751.
- (263) Vuister, G.; Bax, A. Quantitative J correlation: a new approach for measuring homonuclear three-bond $J_{HH\alpha}$ coupling constants in ^{15}N -enriched proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7772–7777.
- (264) Minch, M. Orientational dependence of vicinal proton-proton NMR coupling constants: the Karplus relationship. *Concept Magnetic Res.* **1994**, *6*, 41–56.
- (265) Martin, O.; Villegas, M.; Vila, J.; Scheraga, H. Analysis of $^{13}\text{C}_\alpha$ and $^{13}\text{C}_\beta$ chemical shifts of cysteine and cystine residues in proteins: a quantum chemical approach. *J. Biomol. NMR* **2010**, *46*, 217–225.
- (266) Nilges, M.; Gronenborn, A.; Brünger, A.; Clore, G. Determination of three-dimensional structures of proteins by simulated annealing with interproton distance restraints. Application to crambin, potato carboxypeptidase inhibitor and barley serine proteinase inhibitor 2. *Protein Eng.* **1988**, *2*, 27–38.
- (267) Koradi, R.; Billeter, M.; Wüthrich, K. MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* **1996**, *14*, 51–55.
- (268) Morris, A.-L.; MacArthur, M.; Hutchinson, G.; Thornton, J. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Prot. Struct. Func. Bioinf.* **1992**, *12*, 345–364.
- (269) Laskowski, R.; Rullmann, J.; McArthur, M.; Kaptein, R.; Thornton, J. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 477–486.
- (270) Jarymowycz, V.; Stone, M. Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1624–1671.
- (271) Morin, S. A practical guide to protein dynamics from ^{15}N spin relaxation in solution. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **2011**, *59*, 245–262.
- (272) Lescop, E. Etude par résonance magnétique nucléaire de macromolécules biologiques: structure, dynamique et interactions. Application à une protéine de liaison aux odeurs, Université Paris XI, 2003.
- (273) Lipari, G.; Szabo, A. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. I - Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4546–4559.
- (274) Lipari, G.; Szabo, A. Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. II - Analysis of experimental results. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4559–4570.
- (275) Clore, G.; Driscoll, P.; Wingfield, P.; Gronenborn, A. Analysis of the backbone dynamics of interleukin-1 β using two-dimensional inverse detected heteronuclear ^{15}N - ^1H NMR spectroscopy. *Biochemistry* **1990**, *29*, 7387–7401.
- (276) Johnson, B.; Blevins, R. NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* **1994**, *4*, 603–614.
- (277) Fushman, D.; Cahill, S.; Cowburn, D. The main-chain dynamics of the dynamin pleckstrin homology (PH) domain in solution: analysis of ^{15}N relaxation with monomer/dimer equilibration. *J. Mol. Biol.* **1997**, *266*, 173–194.
- (278) Hall, J.; Fushman, D. Characterization of the overall and local dynamics of a protein with intermediate rotational anisotropy: differentiating between conformational exchange and anisotropic diffusion in the B3 domain of protein G. *J. Biomol. NMR* **2003**, *27*, 261–275.
- (279) Stapley, B.; Creamer, T. A survey of left-handed polyproline II helices. *Protein Sci.* **1999**, *8*, 587–595.
- (280) Pan, S.; Rajniak, J.; Maksimov, M.; Link, J. The role of a conserved threonine residue

- in the leader peptide of lasso peptide precursors. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1880–1882.
- (281) Severinov, K.; Semenova, E.; Kazakov, A.; Kazakov, T.; Gelfand, M. Low-molecular-weight post-translationally modified microcins. *Mol. Microbiol.* **2007**, *65*, 1380–1394.
- (282) Velásquez, J.; van der Donk, W. Genome mining for ribosomally synthesized natural products. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 11–21.
- (283) Pérot-Taillandier, M.; Zirah, S.; Rebuffat, S.; Linne, U.; Marahiel, M.; Cole, R.; Tabet, J.-C.; Afonso, C. Determination of peptide topology through time-resolved double-resonance under electron capture dissociation conditions. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4957–4964.
- (284) Ducasse, R.; Yan, K.-P.; Goulard, C.; Blond, A.; Li, Y.; Lescop, E.; Guittet, E.; Rebuffat, S.; Zirah, S. Sequence determinants governing the topology and biological activity of a lasso peptide, microcin J25. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 371–380.
- (285) Kuznedelov, K.; Semenova, E.; Knappe, T.; Mukhamedyarov, D.; Srivastava, A.; Chatterjee, S.; Ebright, R.; Marahiel, M.; Severinov, K. The antibacterial threaded-lasso peptide capistruin inhibits bacterial RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **2011**, *412*, 842–848.

Annexes

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des structures PDB présentées

Molécules	Référence PDB
<i>θ</i>-défensines	
RTD-1	1HVZ
rétrocycline2	2ATG
Cyclotides	
kalata B1	1NB1
kalata B7	2JWM
varvF	3E4H
McoTI-II	1IB9
cycloviolacine O1	1NBJ
palicouréine	1R1F
tricyclone A	1YP8
kalata B8	2B38
Conotoxines	
Vc1.1	2H8S
pl14a	2FQC
TxVIA	1FU3
PVIA	1AV3
GIIB	1GIB
MrVIB	1RMK
MVIC	1OMN
Lantibiotiques	
nisine A	1WCO
mersacidine	1MQX
Bactériocines circulaires	
entérocline AS-48	1E68
subtilosine A	1PXQ
carnocycline A	2KJF
Peptides lasso	
MccJ25	1Q71, 1PP5
MccJ25 hydrolysée	1S7P
RP-71955	1RPB
BI-32169	3NJW
astexine-1	2LTI
svicéucine	2LS1
Autres molécules	
ToIC	1EK9
FhuA	1BY3
ARNpol	1IW7
glucagon	1GCN

Annexe 2 : Fichiers de contraintes de distance et d'angles utilisés pour la modélisation moléculaire de la svicéucine

Contraintes de distance

```
! NOESY 150ms integration 0.01 30 150 150
! reference HB1 1/HB2 1      1,8A      +-30%
```

```
!residu 1
```

```
assign (resid 1 and name HB1) (resid 1 and name HB2) 1.8 0.0 0.5
assign (resid 1 and name HB*) (resid 1 and name HN) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 1 and name HN) (resid 2 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 1 and name HB*) (resid 2 and name HN) 3.8 1.1 1.1
assign (resid 1 and name HB*) (resid 2 and name HG*) 4.0 1.2 1.2
assign (resid 9 and name HB1) (resid 1 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 9 and name HB2) (resid 1 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 1 and name HB*) (resid 10 and name HD*) 3.9 1.2 1.2
assign (resid 1 and name HA) (resid 14 and name HN) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 1 and name HB*) (resid 14 and name HN) 4.1 1.2 1.2
```

```
!residu 2
```

```
assign (resid 2 and name HB) (resid 2 and name HN) 3.4 1.0 1.0
assign (resid 2 and name HG*) (resid 2 and name HN) 2.5 0.7 0.8
assign (resid 2 and name HA) (resid 2 and name HG*) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 2 and name HA) (resid 2 and name HB) 2.4 0.6 0.7
assign (resid 2 and name HG1*) (resid 2 and name HG2*) 2.4 0.6 0.7
assign (resid 2 and name HB) (resid 2 and name HG*) 2.2 0.4 0.4
assign (resid 2 and name HB) (resid 3 and name HN) 2.1 0.3 0.6
assign (resid 2 and name HG*) (resid 3 and name HN) 3.0 0.9 0.9
assign (resid 2 and name HG*) (resid 5 and name HN) 4.0 1.2 1.2
assign (resid 9 and name HB*) (resid 2 and name HN) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 2 and name HG*) (resid 15 and name HB) 3.4 1.0 1.0
assign (resid 16 and name HA) (resid 2 and name HN) 3.7 1.1 1.1
assign (resid 2 and name HG*) (resid 16 and name HA) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 2 and name HG*) (resid 16 and name HN) 4.4 1.3 1.3
assign (resid 2 and name HG*) (resid 16 and name HB*) 3.7 1.1 1.1
assign (resid 2 and name HB) (resid 17 and name HE1) 3.7 1.1 1.1
assign (resid 2 and name HB) (resid 17 and name HZ2) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 2 and name HG*) (resid 17 and name HD1) 3.0 0.9 0.9
assign (resid 2 and name HG*) (resid 17 and name HN) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 2 and name HG*) (resid 17 and name HE1) 3.0 0.9 0.9
```

```
!residu 3
```

```
assign (resid 3 and name HB2) (resid 3 and name HN) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 3 and name HB1) (resid 3 and name HN) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 3 and name HN) (resid 3 and name HD1) 4.1 1.2 1.2
assign (resid 3 and name HB*) (resid 3 and name HE3) 3.0 0.9 0.9
assign (resid 3 and name HB*) (resid 3 and name HD1) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 3 and name HD1) (resid 3 and name HE1) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 3 and name HB*) (resid 4 and name HN) 3.5 1.1 1.1
assign (resid 3 and name HD1) (resid 4 and name HN) 3.9 1.2 1.2
assign (resid 4 and name HA*) (resid 3 and name HD1) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 3 and name HN) (resid 17 and name HE1) 3.8 1.1 1.1
assign (resid 3 and name HN) (resid 17 and name HZ2) 3.8 1.1 1.1
```

```
!residu 4
```

```
assign (resid 4 and name HA*) (resid 4 and name HN) 2.3 0.5 0.7
assign (resid 4 and name HA1) (resid 4 and name HA2) 1.8 0.0 0.5
assign (resid 4 and name HN) (resid 5 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 4 and name HA*) (resid 5 and name HN) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 15 and name HG2*) (resid 4 and name HN) 3.5 1.1 1.1
assign (resid 4 and name HA*) (resid 17 and name HE1) 3.1 0.9 0.9
```

```

!residu 5
assign (resid 5 and name HA1) (resid 5 and name HA2) 1.8 0.0 0.5
assign (resid 5 and name HA*) (resid 5 and name HN) 2.4 0.6 0.7
assign (resid 5 and name HA*) (resid 6 and name HN) 2.5 0.7 0.8
assign (resid 5 and name HA*) (resid 7 and name HN) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 15 and name HB) (resid 5 and name HN) 2.3 0.5 0.7
assign (resid 15 and name HG2*) (resid 5 and name HN) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 5 and name HN) (resid 17 and name HD1) 3.4 1.0 1.0
assign (resid 5 and name HN) (resid 17 and name HE1) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 5 and name HA*) (resid 17 and name HA) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 5 and name HA*) (resid 17 and name HD1) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 5 and name HA*) (resid 17 and name HE1) 4.0 1.2 1.2

!residu 6
assign (resid 6 and name HB*) (resid 6 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 6 and name HN) (resid 7 and name HN) 2.4 0.6 0.7
assign (resid 6 and name HB*) (resid 7 and name HN) 3.8 1.1 1.1

!residu 7
assign (resid 7 and name HA) (resid 7 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 7 and name HB1) (resid 7 and name HN) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 7 and name HB2) (resid 7 and name HN) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 7 and name HA) (resid 8 and name HN) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 7 and name HB*) (resid 8 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 15 and name HA) (resid 7 and name HN) 3.9 1.2 1.2
assign (resid 15 and name HB) (resid 7 and name HN) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 15 and name HG2*) (resid 7 and name HN) 3.7 1.1 1.1
assign (resid 16 and name HB*) (resid 7 and name HB*) 4.2 1.3 1.3

!residu 8
assign (resid 8 and name HA) (resid 8 and name HN) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 8 and name HB) (resid 8 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 8 and name HG2*) (resid 8 and name HN) 3.5 1.1 1.1
assign (resid 8 and name HB) (resid 8 and name HA) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 8 and name HB) (resid 8 and name HG2*) 2.5 0.7 0.8
assign (resid 8 and name HA) (resid 8 and name HG2*) 3.0 0.9 0.9
assign (resid 8 and name HB) (resid 9 and name HN) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 8 and name HG2*) (resid 9 and name HN) 3.0 0.9 0.9
assign (resid 8 and name HG2*) (resid 10 and name HN) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 8 and name HG2*) (resid 10 and name HA) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 8 and name HG2*) (resid 11 and name HA) 3.0 0.9 0.9
assign (resid 8 and name HG2*) (resid 14 and name HN) 3.8 1.1 1.1
assign (resid 8 and name HA) (resid 15 and name HA) 2.2 0.4 0.4
assign (resid 8 and name HA) (resid 15 and name HB) 3.9 1.2 1.2
assign (resid 8 and name HA) (resid 15 and name HG2*) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 8 and name HA) (resid 16 and name HN) 3.3 1.0 1.0

!residu 9
assign (resid 9 and name HB*) (resid 9 and name HN) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 9 and name HB*) (resid 9 and name HA) 2.5 0.7 0.8
assign (resid 9 and name HA) (resid 10 and name HN) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 9 and name HN) (resid 10 and name HN) 2.4 0.6 0.7
assign (resid 9 and name HN) (resid 15 and name HN) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 15 and name HA) (resid 9 and name HN) 2.5 0.7 0.8
assign (resid 15 and name HG2*) (resid 9 and name HN) 4.2 1.3 1.3
assign (resid 9 and name HA) (resid 16 and name HB*) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 9 and name HB*) (resid 16 and name HA) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 9 and name HB*) (resid 16 and name HB*) 2.8 0.8 0.8

!residu 10
assign (resid 10 and name HB*) (resid 10 and name HN) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 10 and name HB*) (resid 10 and name HA) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 10 and name HA) (resid 10 and name HD*) 3.4 1.0 1.0
assign (resid 10 and name HA) (resid 11 and name HN) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 10 and name HN) (resid 13 and name HB*) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 10 and name HB*) (resid 13 and name HB*) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 10 and name HN) (resid 14 and name HN) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 10 and name HB1) (resid 14 and name HN) 4.1 1.2 1.2

```

```

assign (resid 10 and name HB2) (resid 14 and name HN) 4.1 1.2 1.2

!residu 11
assign (resid 11 and name HA) (resid 11 and name HG) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 11 and name HA) (resid 12 and name HN) 2.2 0.4 0.4

!residu 12
assign (resid 12 and name HA*) (resid 12 and name HN) 2.5 0.7 0.8
assign (resid 12 and name HA1) (resid 12 and name HA2) 1.8 0.0 0.5

!residu 13
assign (resid 13 and name HB1) (resid 13 and name HB2) 2.0 0.2 0.6
assign (resid 13 and name HB*) (resid 14 and name HN) 2.4 0.6 0.7

!residu 14
assign (resid 14 and name HA*) (resid 14 and name HN) 2.4 0.6 0.7
assign (resid 14 and name HN) (resid 15 and name HN) 3.7 1.1 1.1
assign (resid 14 and name HA*) (resid 15 and name HN) 2.1 0.3 0.6
assign (resid 14 and name HA*) (resid 15 and name HA) 3.7 1.1 1.1
assign (resid 15 and name HG2*) (resid 14 and name HN) 4.3 1.3 1.3
assign (resid 14 and name HA*) (resid 15 and name HG2*) 2.9 0.9 0.9

!residu 15
assign (resid 15 and name HG2*) (resid 15 and name HN) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 15 and name HA) (resid 15 and name HB) 2.3 0.5 0.7
assign (resid 15 and name HG2*) (resid 15 and name HB) 2.1 0.3 0.6
assign (resid 15 and name HA) (resid 15 and name HG2*) 2.5 0.7 0.8
assign (resid 15 and name HN) (resid 16 and name HN) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 15 and name HA) (resid 16 and name HN) 2.4 0.6 0.7
assign (resid 15 and name HA) (resid 16 and name HB*) 3.7 1.1 1.1
assign (resid 15 and name HB) (resid 16 and name HN) 2.1 0.3 0.6
assign (resid 15 and name HG2*) (resid 16 and name HN) 3.4 1.0 1.0

!residu 16
assign (resid 16 and name HB*) (resid 16 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 16 and name HA) (resid 16 and name HB*) 2.3 0.5 0.7
assign (resid 16 and name HA) (resid 17 and name HD1) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 16 and name HA) (resid 17 and name HN) 2.4 0.6 0.7
assign (resid 16 and name HB*) (resid 17 and name HD1) 4.5 1.4 1.4
assign (resid 16 and name HB*) (resid 18 and name HN) 4.0 1.2 1.2
assign (resid 16 and name HB*) (resid 19 and name HN) 4.2 1.3 1.3
assign (resid 19 and name HA) (resid 16 and name HB*) 3.8 1.1 1.1

!residu 17
assign (resid 17 and name HB*) (resid 17 and name HN) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 17 and name HN) (resid 17 and name HD1) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 17 and name HA) (resid 17 and name HD1) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 17 and name HB1) (resid 17 and name HB2) 1.9 0.1 0.6
assign (resid 17 and name HB2) (resid 17 and name HD1) 3.4 1.0 1.0
assign (resid 17 and name HB1) (resid 17 and name HD1) 3.4 1.0 1.0
assign (resid 17 and name HB*) (resid 17 and name HE3) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 17 and name HD1) (resid 17 and name HE1) 2.5 0.7 0.8
assign (resid 17 and name HN) (resid 18 and name HN) 2.7 0.8 0.8

!residu 18
assign (resid 18 and name HA) (resid 18 and name HG1*) 3.2 1.0 1.0
assign (resid 18 and name HB) (resid 18 and name HG1*) 2.9 0.9 0.9
assign (resid 18 and name HA) (resid 19 and name HN) 2.3 0.5 0.7
assign (resid 18 and name HB) (resid 19 and name HN) 3.5 1.1 1.1
assign (resid 18 and name HG2*) (resid 19 and name HN) 3.1 0.9 0.9

!residu 19
assign (resid 19 and name HA) (resid 19 and name HN) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 19 and name HB*) (resid 19 and name HN) 2.7 0.8 0.8
assign (resid 19 and name HB*) (resid 19 and name HA) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 19 and name HB1) (resid 19 and name HB2) 1.8 0.0 0.5
assign (resid 19 and name HA) (resid 20 and name HN) 2.8 0.8 0.8
assign (resid 19 and name HB*) (resid 20 and name HN) 3.4 1.0 1.0

```



```

!residu 20
assign (resid 20 and name HA) (resid 20 and name HN) 3.1 0.9 0.9
assign (resid 20 and name HB) (resid 20 and name HN) 3.7 1.1 1.1
assign (resid 20 and name HA) (resid 20 and name HB) 3.4 1.0 1.0

!Ambigu

assign (resid 16 and name HB*)
      (resid 7 and name HB* or resid 17 and name HB*) 3.3 1.0 1.0
assign (resid 9 and name HN)
      (resid 8 and name HA or resid 9 and name HA) 2.1 0.3 0.6
assign (resid 14 and name HA*)
      (resid 1 and name HA or resid 2 and name HA) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 18 and name HA)
      (resid 18 and name HG2* or resid 18 and name HD*) 2.6 0.8 0.8
assign (resid 9 and name HN)
      (resid 11 and name HA or resid 14 and name HA*) 3.6 1.1 1.1
assign (resid 15 and name HB)
      (resid 2 and name HN or resid 15 and name HN) 2.4 0.6 0.7

!angles
assign (resid 1 and name C )
      (resid 2 and name N )
      (resid 2 and name CA )
      (resid 2 and name C ) 1.0 -120.0 30.0 2
assign (resid 2 and name C )
      (resid 3 and name N )
      (resid 3 and name CA )
      (resid 3 and name C ) 1.0 -120.0 45.0 2
assign (resid 5 and name C )
      (resid 6 and name N )
      (resid 6 and name CA )
      (resid 6 and name C ) 1.0 -120.0 45.0 2
assign (resid 6 and name C )
      (resid 7 and name N )
      (resid 7 and name CA )
      (resid 7 and name C ) 1.0 -120.0 45.0 2
assign (resid 7 and name C )
      (resid 8 and name N )
      (resid 8 and name CA )
      (resid 8 and name C ) 1.0 -120.0 45.0 2
assign (resid 8 and name C )
      (resid 9 and name N )
      (resid 9 and name CA )
      (resid 9 and name C ) 1.0 -120.0 30.0 2
assign (resid 9 and name C )
      (resid 10 and name N )
      (resid 10 and name CA )
      (resid 10 and name C ) 1.0 -120.0 45.0 2
assign (resid 14 and name C )
      (resid 15 and name N )
      (resid 15 and name CA )
      (resid 15 and name C ) 1.0 -120.0 30.0 2
assign (resid 15 and name C )
      (resid 16 and name N )
      (resid 16 and name CA )
      (resid 16 and name C ) 1.0 -120.0 30.0 2
assign (resid 16 and name C )
      (resid 17 and name N )
      (resid 17 and name CA )
      (resid 17 and name C ) 1.0 -120.0 30.0 2
assign (resid 18 and name C )

```

```
      (resid 19 and name N  )
      (resid 19 and name CA )
      (resid 19 and name C  )  1.0   -120.0  30.0  2
assign (resid 19 and name C  )
      (resid 20 and name N  )
      (resid 20 and name CA )
      (resid 20 and name C  )  1.0   -120.0  45.0  2
```

Annexe 3 : Spectres HSQC de MccJ25-¹⁵N à différentes températures

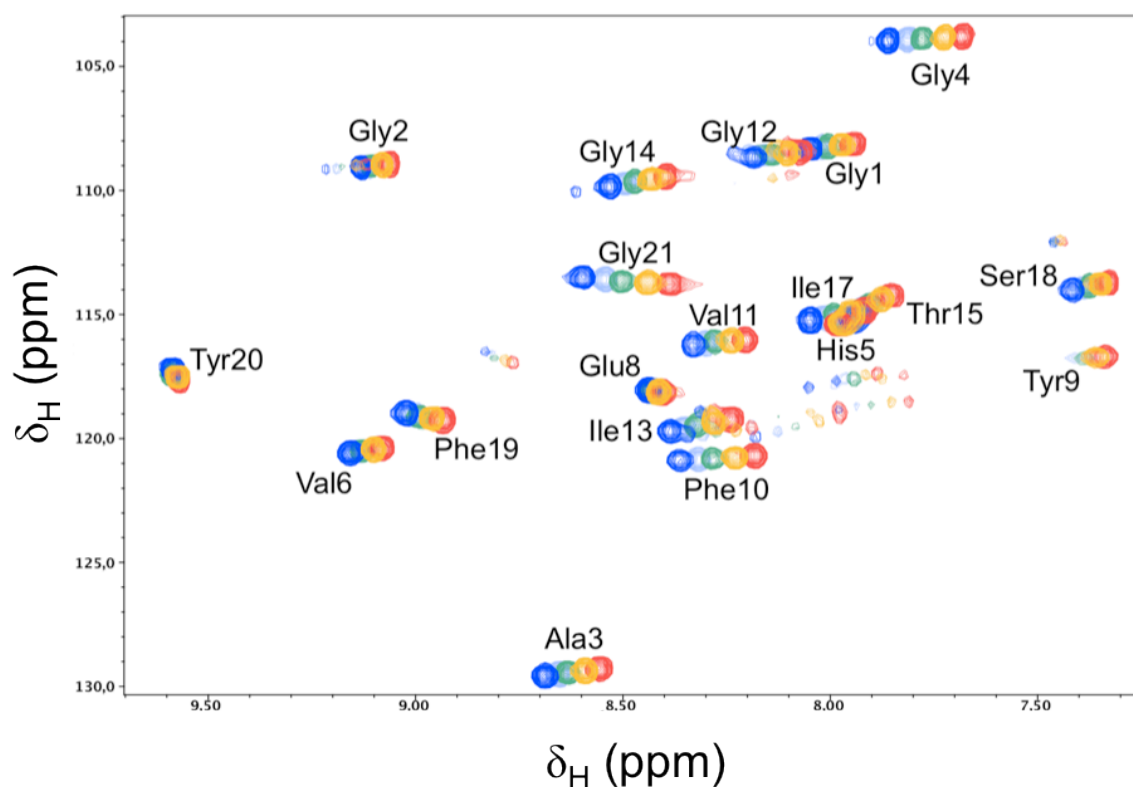


Figure 76 : Spectres HSQC $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ de MccJ25- ^{15}N à différentes températures (d_3 -MeOH, 700 MHz). Bleu : 288 K ; bleu ciel : 293 K ; vert : 298 K ; jaune : 303 K et rouge : 308 K.

Annexe 4 : Relaxation de spin ^{15}N de MccJ25 dans H_2O , à 600 MHz

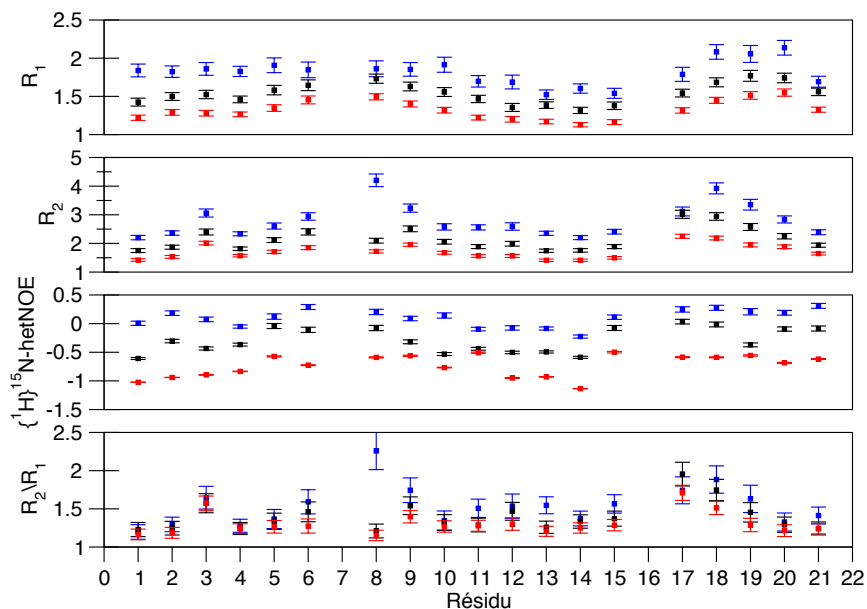


Figure 77 : Paramètres de relaxation ^{15}N de MccJ25 (H_2O , 600 MHz).

Tableau 25 : Paramètres de relaxation ^{15}N moyens de MccJ25 à trois températures différentes.

Température (K)	$\langle R_1 \rangle$ (s^{-1})	$\langle R_2 \rangle$ (s^{-1})	$\langle R_2/R_1 \rangle$
288	$1,82 \pm 0,08$	$2,80 \pm 0,12$	$1,54 \pm 0,14$
298	$1,54 \pm 0,05$	$2,16 \pm 0,09$	$1,40 \pm 0,11$
308	$1,32 \pm 0,04$	$1,73 \pm 0,05$	$1,31 \pm 0,08$

Tableau 26 : Tenseurs de diffusion isotropes de MccJ25 en entier et de ses régions à différentes températures. df : degrés de liberté.

	Température (K)	τ_m (ns)	χ^2/df
MccJ25	288	$1,8 \pm 0,5$	2,79
	298	$1,5 \pm 0,5$	1,57
	308	$1,5 \pm 0,3$	1,09
1-8/19-21	288	$1,3 \pm 0,2$	2,47
	298	$1,2 \pm 0,5$	1,52
	308	$1,4 \pm 0,3$	0,67
9-18	288	$1,2 \pm 0,2$	3,27
	298	$1,9 \pm 0,4$	1,83
	308	$1,7 \pm 0,3$	0,93

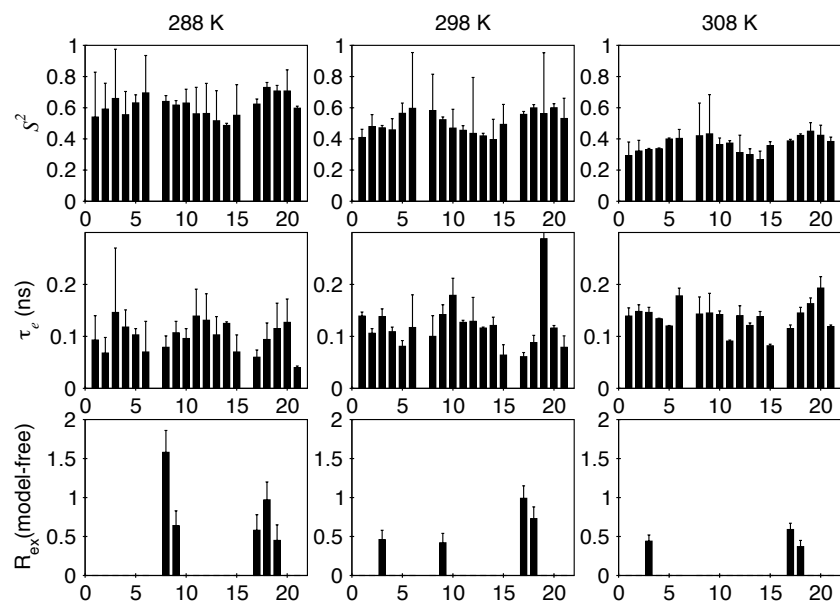


Figure 78 : Paramètres dynamique de MccJ25 (H₂O, 600 MHz). 288 K : τ_m 1,8 ns ; 298 K : τ_m 1,5 ns ; 308 K : τ_m 1,5 ns.

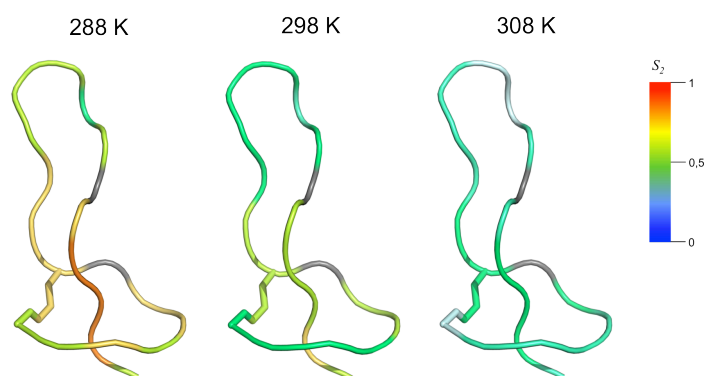


Figure 79 : Représentation des résidus de MccJ25 selon leur paramètre d'ordre S^2 dans H₂O de 288 K (gauche) à 308 K (droite).

Annexe 5 : Analyse des formes réduites et alkylées de la svicéucine

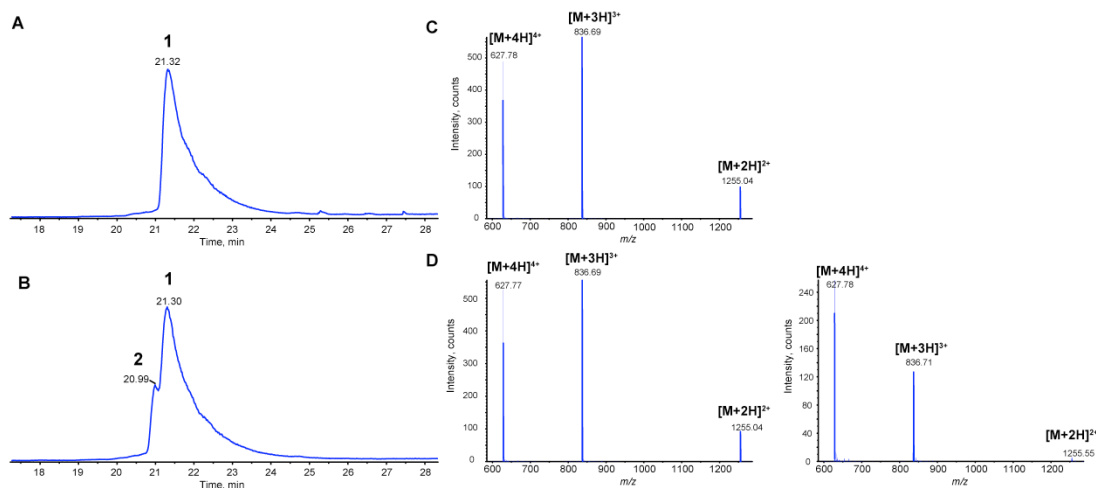


Figure 80 : Analyse LC-MS de la svicéucine réduite et alkylée. Courants ioniques totaux (TIC) après réduction à 37 °C / alkylation (A) et réduction à 95 °C / alkylation (B). Les peptides réduits-alkylés détectés sont notés 1 et 2. Spectres de passe des peptides détectés, après réduction à 37 °C / alkylation (C) et réduction à 95 °C / alkylation (D). Le spectre du peptide 2, détecté uniquement pour la réduction à 95 °C, est montré à droite.

Abstract

Lasso peptides are ribosomally-synthesized and post-translationally modified peptides produced by bacteria, sharing a knotted topology. They present a N-terminal macrolactam ring and the C-terminal tail is threaded through this ring. Strong sterical constraints and/or disulfide bridges stabilize this scaffold. Due to their biological activities (as receptor antagonists, enzyme inhibitors which confer them antiviral or antibacterial activity) and the high stability of their "lasso" structure, they present a great biotechnical interest. This PhD work participates to the comprehension of the sequence determinants governing the topology and the activity of these peptides, using the development of spectroscopic methods.

Structure/activity relationships of microcin J25 (MccJ25), an antibacterial lasso peptide produced by *Escherichia coli*, were examined. MccJ25 variants were generated with a site-directed mutagenesis onto the gene encoding the precursor. The topology of the variants (lasso or cyclic-branched) was determined using LC-MS/MS, carboxypeptidase Y digestion, and in some case NMR. The antibacterial activity on *Salmonella enterica* was measured. Determinants governing the sterical trapping of the C-terminal tail were identified. Residues under the ring (Tyr20, Gly21) and the size of the ring are critical for the topology and the antibacterial activity, whereas the reduction of the loop Tyr9-Ser18 above the ring or the elongation of the C-terminal tail under the cycle maintain the lasso topology but decrease or abolish the activity.

We isolated and characterized a new lasso peptide from *Streptomyces sviveus* and predicted by genome-mining, sviveucin. The tridimensional structure of the peptide was determined by solution NMR. This peptide presents a C-terminal tail threaded through a nine-residues macrolactam ring. Two disulfide bridges between the ring and the tail, Cys1/Cys13 and Cys7/Cys19, stabilize the structure. This new peptide is highly similar to other antimicrobial and antiviral lasso peptides, as RP-71955. It presents an antibacterial activity against Gram-positive bacteria.

Finally, a spectroscopic study of several lasso peptides permits us to describe specific signals of structural regions of lasso peptides. The dynamic study of MccJ25 by ^{15}N spin relaxation shows an inhomogeneity of internal mobility of residues according to their position on the "lasso" topology. Moreover, the study by circular dichroism of MccJ25, sviveucin and capistruin (lasso peptide from *Burkholderia thailandensis*) reveals that some lasso peptides present a 220 nm positive band, specific of the lasso structure.

Keywords: lasso peptides, antimicrobial peptides, microcin J25, spectroscopic methods

Résumé

Les peptides lasso sont des peptides synthétisés par les bactéries selon la voie ribosomale et qui subissent des modifications post-traductionnelles, leur conférant une topologie remarquable incluant un nœud moléculaire. Ils possèdent un cycle macrolactame N-terminal, dans lequel est insérée et piégée la queue C-terminale. Cette topologie est stabilisée par des contraintes stériques et/ou des ponts disulfure. Leurs propriétés biologiques (antagonistes de récepteurs, inhibiteurs d'enzymes pouvant leur conférer des propriétés antivirales ou antibactériennes) et la très grande stabilité de leur structure « lasso » leur confèrent un fort attrait biotechnologique. Ce travail de thèse s'inscrit dans le contexte de compréhension des éléments de séquence gouvernant la topologie et l'activité de ces peptides, à travers le développement de méthodes spectroscopiques.

Les relations structure/activité d'un peptide lasso antibactérien produit par *Escherichia coli*, la microcine J25 (MccJ25) ont été examinées. Une mutagenèse dirigée sur le précurseur a permis de générer des variants de MccJ25, dont la topologie (structure en lasso ou cyclique-branchée) a été déterminée par LC-MS/MS, digestion par la carboxypeptidase Y, et pour certains par RMN. L'activité antibactérienne contre *Salmonella enterica* a été mesurée. Les éléments gouvernant le piégeage stérique de la queue C-terminale dans le cycle macrolactame ont été identifiés. Les résidus situés sous le cycle (Tyr20, Gly21) et la taille du cycle sont critiques pour la topologie et l'activité antibactérienne, tandis que la réduction de la taille de la boucle Tyr9-Ser18 au-dessus du cycle ou l'allongement de la queue C-terminale Tyr20-Gly21 sous le cycle ne perturbent pas la topologie en lasso, mais ont des effets sur l'activité, allant de la réduction à la suppression.

Nous avons isolé et caractérisé un nouveau peptide lasso produit par *Streptomyces sviveus* découvert par exploration des génomes, la svicéucine. La structure tridimensionnelle du peptide a été déterminée d'après les données de RMN en solution. Ce peptide présente un cycle macrolactame de 9 résidus dans lequel est piégée la queue C-terminale, la structure étant stabilisée par deux ponts disulfures cycle-queue, Cys1/Cys13 et Cys7/Cys19. Ce nouveau peptide s'apparente à des peptides lasso antimicrobiens et anti-HIV comme RP 71955. Il possède une activité antimicrobienne contre des bactéries à Gram positif.

Enfin, une étude spectroscopique de différents peptides lasso nous a permis de décrire des signaux caractéristiques des régions structurales de peptides lasso. L'étude de la dynamique de MccJ25 par relaxation de spin ^{15}N en RMN montre une certaine inhomogénéité de la mobilité interne de ses résidus selon leur position dans la structure « lasso ». En outre, l'étude par dichroïsme circulaire de MccJ25, de la svicéucine et de la capistruine (peptide lasso produit par *Bhurkholderia thailandensis*), a révélé que certains peptides lasso présentent une bande positive autour de 220 nm, caractéristique de la topologie lasso.

Mots-clefs : peptides lasso, peptides antimicrobiens, microcine J25, méthodes spectroscopiques