

Proposition de stage M2 : Substrat innovant pour la caractérisation de D-peptidases environnementales

Des études récentes montrent que les **D-peptidases**, des enzymes spécialisées dans la dégradation de peptides contenant des D-aminoacides, **menacent l'efficacité d'antibiotiques** lipopeptidiques tels la [polymyxin B](#), la [daptomycine](#) et plus largement des antibiotiques peptidiques contenant des D-aminoacides. **Etudier** ce type d'enzyme est important, car il constitue **un nouveau mécanisme d'antibiorésistance**.

Ces enzymes, produites par des bactéries pour réguler la concentration des antibiotiques qu'elles synthétisent, ont été identifiées par criblage in-silico de génomes bactériens sans que leur importance environnementale n'ait été étudiée. Ce projet de thèse vise à développer une banque de **substrats innovants** permettant de **détecter, marquer** ces D-peptidases par une étiquette fluorescente pour les **isoler** dans des échantillons environnementaux (Figure 1). Leur identification pourrait aussi révéler de nouveaux composés antibiotiques renforçant ainsi les thérapies existantes menacées par l'antibiorésistance.

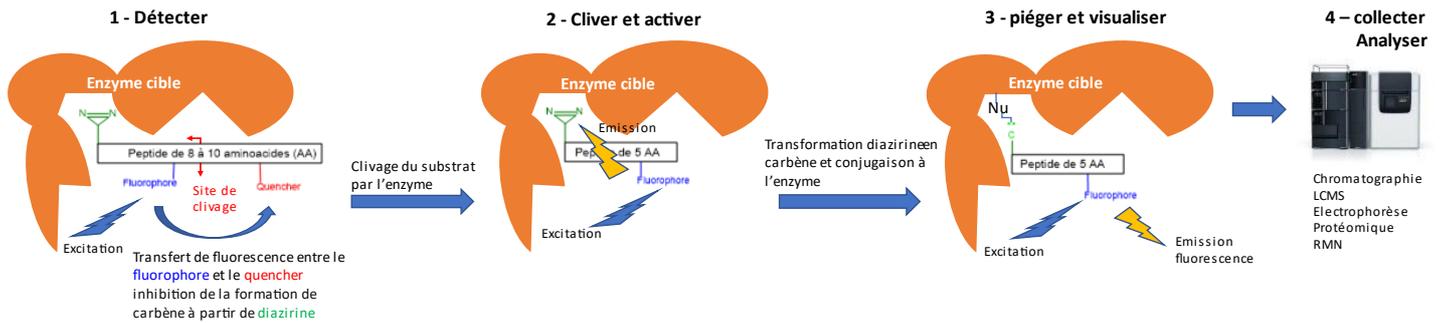


Figure 1 : Présentation schématique du principe du substrat (Piège/visualise/collecte)

Dans le cadre de ce stage nous souhaitons mettre au point des substrats enzymatiques innovants permettant de conjuguer à une enzyme une étiquette fluorescente pour visualiser puis collecter l'enzyme cible (Figure 1). Cette approche combine plusieurs concepts avancés de chimie et de biochimie, et elle pourrait être extrêmement utile pour l'étude d'interactions enzyme-substrat et l'analyse d'interactomes dans un environnement complexe. Les concepts utilisés dans la conception de ce substrat innovant permettant la triple action (piège/visualise/collecte) peuvent être détaillés comme suit (Figure 1). Un substrat à fluorescence réprimée (ou quenché) est composé d'une sonde fluorescente (coumarine, fluorescéine, ...) qui irradiée à sa longueur d'onde d'excitation émet à une longueur d'onde définie qui peut être captée par un répresseur de fluorescence (quencher) se trouvant à proximité. Ainsi tant que l'enzyme n'a pas clivé le substrat, la fluorescence est éteinte en raison de la proximité du quencher, cette interaction de type FRET (Transfert d'Énergie de Résonance de Fluorescence) entre un fluorophore et un accepteur est un concept établi en biochimie. Une fois le substrat clivé par l'enzyme, le quencher s'éloigne, ce qui permet à la fois, de révéler la fluorescence (visualise) puis d'induire la réaction photochimique permettant de transformer le groupement photoactivable en une entité réactive se trouvant à proximité de l'enzyme et d'induire ainsi la formation d'une liaison à proximité du site actif (piège). La protéine ainsi marquée peut ensuite être séparée de sa matrice par des techniques d'électrophorèse ou de chromatographie (collecte). Les enzymes nouvelles pourront ensuite être caractérisées par des approches de protéomiques.

Toutefois, avant de tester cette approche sur des échantillons environnementaux, il est nécessaire de la valider sur des enzymes modèles dont la spécificité de substrat et les séquences sont connues. Ainsi, deux enzymes bactériennes modèles ont été choisies, la thermolysine et la subtilisine A représentatives respectivement de la classe des métallopeptidases et des serines protéases. Pour ces deux enzymes des substrats sont connus et permettront de tester l'approche proposée (Table 1).

Table 1 : Exemple de substrats à fluorescence quenchée de la : subtilisine de Carlsberg (Aldrich P3910) lignes 1-6 (Meldal et al PNAS, 1994, 91, 3314-18) ; thermolysine (Aldrich P1512) ligne 7 (Oda et al FEBS letters, 2005, 579, 5013-18)

	P5	P4	P3	P2	P1	P'1	P'2	P'3	P'4	P'5	K _{cat} /K _m
1	Y(NO ₂)	F	Q	P	L	D	E	K(Abz)	G	D	32,000
1'	Y(NO ₂)	F	Q	L	L	D	E	K(Abz)	G	D	22,000
2	Y(NO ₂)	F	Q	K	L	D	E	K(Abz)	G	D	130,000
3	Y(NO ₂)	F	Q	P	L	D	V	K(Abz)	G	D	200,000
4	Y(NO ₂)	I	A	P	L	A	T	K(Abz)	G	D	210,000
5	Y(NO ₂)	F	Q	P	L	A	E	K(Abz)	G	D	220,000
6	Y(NO ₂)	F	Q	A	L	D	E	K(Abz)	G	D	290,000
7	D-(A2Pr)	G	F	K	F	L	G	K	K(2,4DNP)		

Y(NO₂): quencher: 3-nitrotyrosine, , K(2,4-DNP) ε(2,4-dinitrobenzyl)lysine ; Fluorophore: K(Abz) ε(2-aminobenzoyl)lysine, D-(A2Pr) D-2-amino-3-[[2-(methylamino)benzoyl]amino]propanoic acid.

Ce projet s'adresse à un étudiant de M2 souhaitant travailler à l'interface entre la chimie et la biochimie. Des connaissances en synthèse et purification de peptide seraient un plus.

But du stage : Dans un premier temps il s'agira de vérifier que le concept proposé est efficace. Cela permettra d'initier l'étudiant de master à la synthèse peptidique sur phase solide et à la purification des peptides synthétisés par HPLC semi-préparative. Les peptides purifiés seront ensuite caractérisés par RMN, spectrométries de masse, UV et de fluorescence.

Compétences acquises : SPPS, techniques d'analyse et purification de peptide.

Tâche 1 (45 jours) : Synthèse, purification et caractérisation des substrats par SPPS. Préparation d'un substrat pour chaque enzyme et des produits de clivage.

Tâche 2 (45 jours) : Etude de la stabilité des peptides sous irradiation UV. Dans une étude préliminaire, les substrats et les produits de clivages seront irradiés à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore afin de quantifier leur durée de demi-vie et ainsi de mesurer l'atténuation de dégradation induite par le quencher.

Tâche 3 (45 jours) : Test de dégradation des peptides et de liaison aux enzymes cibles. La dégradation des substrats sera testée en présence des enzymes cibles et suivie en plaque 96 puits sur un lecteur de microplaque.

Tâche 4 (45 jours) : Mise en forme des résultats sous forme d'un preprint

Le stage d'une durée de 6 mois sera gratifié et débutera en janvier ou en février selon les disponibilités des candidats.

Les étudiants intéressés par ce projet, peuvent postuler en adressant un CV et une lettre de motivation.

Contact : Pr N. Inguibert

nicolas.inguibert@univ-perp.fr