

Caractérisation des enzymes impliquées dans la voie d'excision de la première méthionine des protéines synthétisées dans les mitochondries et les plastes¹.

par **Alexandre Serero**

François Blondon². – Le mécanisme universel de synthèse des protéines impose que toutes les protéines débutent par une méthionine. Pourtant cette première méthionine sera le plus souvent clivée alors que la protéine est encore en cours de synthèse. Le mécanisme responsable de cette modification cotraductionnelle est celui de la NME (Excision de la Méthionine N-terminale) : il est assuré par une activité méthionine aminopeptidase (MAP) et par une activité peptide déformylase (PDF). Ce processus est actuellement la cible de plusieurs drogues à effets thérapeutiques (antibiotiques et anticancéreux).

Pendant longtemps la voie de la NME a été considérée comme absente des organites. Pourtant certaines données suggèrent que des protéines codées par les organites de plantes ont subi la NME. Dans ce contexte, la thèse a consisté à identifier et caractériser les enzymes impliquées dans la voie de NME dans les mitochondries et les plastes, à l'Institut des Sciences du Végétal (CNRS-Gif) dans le groupe de T. Meinnel.

Au laboratoire, des séquences codant des homologues des PDFs et MAPs bactériennes ont été identifiées chez la plupart des génomes eucaryotes. Les formes issues de l'*homme* et des plantes *Arabidopsis thaliana* et *Lycopersicum esculentum* ont été isolées. Ces enzymes sont spécifiquement localisées dans les organites et les homologues des PDFs présentent bien, *in vivo* et *in vitro*, une activité déformylase. Les PDFs chloroplastiques (PDF1Bs) sont très proches fonctionnellement des PDFs bactériennes alors que les PDFs mitochondriales (PDF1As) présentent des caractéristiques biochimiques originales. Les PDF1As animales, dont l'activité se comporte de manière similaire à celle des PDF1Bs, se distinguent par la présence d'au moins deux substitutions dans les séquences-signature des PDFs. Le remplacement de ces résidus par leurs pendants des PDF1As de plantes a permis de retrouver les caractéristiques des PDF1As de plantes.

La mise en évidence, pour la première fois, de l'existence d'une voie de la NME (Excision de la Méthionine N-terminale) dans les plastes permet de ne plus considérer les plantes comme une exception. De plus la présence d'une PDF1A aux caractéristiques uniques, permet de distinguer le mécanisme de la NME mitochondriale de celui des NMEs bactériennes et chloroplastiques. Nul doute, qu'à plus ou moins long terme, ces résultats déboucheront sur des applications agronomiques importantes. Ce travail très original mérite donc pleinement une récompense.

¹ Thèse de Doctorat PARIS XI-ORSAY, 2004, 164 pages+annexes, 65 pages.

² Membre de l'Académie d'Agriculture de France, directeur de recherche honoraire du CNRS, Institut des Sciences du Végétale, 91918 Gif sur Yvette.

Alexandre SERERO

18, rue Victor Hugo
92 270 Bois-Colombes
Tél. : 01 56 05 38 26
alexserero@yahoo.fr

Né le 4 Octobre 1976 (28 ans)
Nationalité française

Docteur en Biochimie – Biologie Moléculaire (spécialité : biochimie des protéines)

Lauréat du Prix Dina-Surdin 2004

(Prix distinguant des travaux de thèse et attribué par la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire)

COMPETENCES

Expérience

2000-2004 : Chercheur-doctorant

Dans le groupe de T. Meinnel "maturation des protéines", CNRS, Gif/Yvette-France.

Publication : 3

Encadrement : 1 Etudiant DEA

Sujet : La peptide déformylase, une cible pour de nouveaux antibiotiques : étude de la réactivité des déformylases bactériennes et de ses homologues eucaryotes.

1999-2000 : Assistant-chercheur

Dans le groupe de T. Meinnel "maturation des protéines", CNRS, Gif/Yvette-France.

Publication : 1.

1998-1999 : Assistant d'un doctorant

Dans le groupe de W. Lockau « Biochemie der Pflanzen », Humboldt-Universität,

Berlin-Allemagne.

Expertise technique

- Biochimie : - SDS-PAGE, Western Blot, **Expression de protéines recombinantes** chez *E. coli*, **Purification de protéines par FPLC.**
- Biologie Moléculaire : - **Clonages moléculaires**, constructions de vecteurs par simulation *in silico*, **Mutagenèse dirigée**, synthèse de gènes.
- Spectroscopie : - Dosage enzymatique continu.
- Microbiologie : - **Tests de complémentation génétique**, Tests de sensibilité de souches bactériennes à des antibiotiques.
- Biologie cellulaire : - Transformation de cellules par bombardement balistique, **Microscopie à épifluorescence.**

Informatique : Word, Excel, Powerpoint, Photoshop et Netscape

Langues étrangères : - Anglais : courant
- Allemand : bonnes connaissances

FORMATION

2000-2004 : **Doctorat** (Ecole Doctorale « Innovation thérapeutique » - Paris XI) (soutenue le 17 septembre 2004)

1999-2000 : **DEA** "Structure, Fonction et Ingénierie des Protéines" (Paris XI)

1998-1999 : **Licence et Maîtrise** "Biochimie" (Paris VII)

1994-1997 : **DEUG** "Sciences de la Vie et de la Terre" (Paris VII)

1993-1994 : **Baccalauréat** (série C)

CENTRES D'INTERET

Sport : Handball

Musique : Rock et Soul Music des années 60-70

Littérature policière

ANNEXES

Publications

1. **Serero, A.**, Giglione, C., Sardini, A., Martinez-Sanz; J. & Meinnel, T. (2003) An unusual peptide deformylase features in the human mitochondrial N-terminal methionine excision pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 52953-52963
2. **Serero, A.**, Giglione, C. & Meinnel, T. (2001) Seeking new targets for antiparasitic agents. *Trends Parasitol.*, **17**, 7-8.
3. **Serero, A.**, Giglione, C. & Meinnel, T. (2001). Distinctive features of the two classes of eukaryotic peptide deformylases. *J. Mol. Biol* **314**, 695-708.

La **couverture** de ce numéro de la revue *Journal of Molecular Biology* a été réalisée d'après les données publiées dans l'article ci-dessus.

4. Giglione, C., **Serero, A.**, Pierre, M., Boisson, B. & Meinnel, T. (2000) Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanisms. *EMBO J.* **19**, 5916-5929.

RÉSUMÉ des TRAVAUX de THÈSE (2000-2004)

Sujet : Caractérisation des enzymes impliquées dans la voie d'excision de la première méthionine des protéines synthétisées dans les mitochondries et les plastes.

Le mécanisme universel de synthèse des protéines impose que toutes les protéines débutent par une méthionine. Pourtant cette première méthionine sera le plus souvent clivée alors que la protéine est encore en cours de synthèse. Le mécanisme d'excision de la méthionine N-terminale (NME) est responsable de cette modification co-translationnelle. Dans le cytoplasme eucaryote la NME est assurée par une activité méthionine aminopeptidase (MAP). Chez les eubactéries, où la méthionine initiatrice est N-formylée, il existe une activité peptide déformylase (PDF) supplémentaire. L'activité de la MAP bactérienne est alors subordonnée au clivage antérieur du groupement N-formyle par la PDF. La fonction de la NME est essentielle chez les bactéries et dans le cytoplasme de la levure. Ce processus est actuellement la cible de plusieurs drogues à effets thérapeutiques (antibiotiques pour les PDFs et anticancéreux pour la MAP2 humaine).

Comme les PDFs bactériennes sont considérées comme des cibles originales particulièrement prometteuses pour de nouveaux antibiotiques, le mécanisme de la NME a été particulièrement étudié chez les procaryotes. En revanche peu de données concernant la NME chez les eucaryotes supérieurs étaient disponibles. En effet, chez ces organismes peu de MAPs (hormis la MAP2 humaine) ont été caractérisées et le caractère essentiel de la NME cytoplasmique n'y a encore jamais été démontré. De plus la voie de la NME était considérée comme absente des organites (mitochondries et plastes) où le mécanisme de synthèse des protéines est très similaire à celui des bactéries (la méthionine initiatrice y est aussi N-formylée). Néanmoins une analyse des données disponibles dans la littérature nous a indiqué que certaines protéines synthétisées dans les organites de plantes supérieures perdent leur groupe N-formyle ou leur N-formylméthionine. Ceci nous a suggéré qu'il pourrait exister dans les organites des plantes un mécanisme d'excision de la méthionine N-terminale. Dans ce contexte mon projet de thèse a consisté à identifier et caractériser les enzymes impliquées dans la voie de la NME dans les mitochondries et le plaste.

Grâce aux données de plus en plus nombreuses concernant le séquençage des génomes eucaryotes, nous avons pu identifier chez les plantes supérieures *Arabidopsis thaliana* (arabette) et chez *Lycopersicon esculentum* (tomate) des séquences codant des homologues des PDFs et MAPs bactériennes. Après avoir cloné les séquences au laboratoire nous avons montré que les homologues de PDFs (PDF1As et 1Bs) et de MAPs (MAP1Ds) de plantes sont spécifiquement adressés vers les organites. En particulier les PDF1As sont exportées exclusivement vers les mitochondries alors que les PDF1Bs sont exportées à la fois vers les mitochondries et les chloroplastes. L'expression de ces protéines dans des souches bactériennes présentant une expression conditionnelle de leur gène *def* ou *map* a permis de démontrer que les homologues de plantes possèdent bien une activité PDF ou MAP *in vivo*. Enfin grâce à l'obtention d'anticorps dirigés spécifiquement contre chacune des deux sous-classes de PDFs nous avons pu détecter l'expression des PDF1As et 1Bs dans les tissus de plantes. Les PDF1As et 1Bs détectées *in vivo* correspondent à des formes maturées qui ont probablement perdu leur extension N-terminale, lors de la pénétration dans l'organite. L'ensemble de ces résultats démontre pour la première fois l'existence d'une machinerie cellulaire spécifiquement dédiée à l'excision de la N-méthionine des protéines synthétisées dans les organites d'un organisme eucaryote.

Nous avons ensuite entrepris une caractérisation biochimique approfondie des PDFs de plantes qui a montré que les deux classes de PDFs partagent peu d'éléments en commun : ainsi outre leur

faible homologie de séquence, les PDFs mitochondriales (PDF1As) se distinguent des PDFs chloroplastiques et bactériennes (PDF1Bs) (i) par une activité élevée et stable en l'absence d'agents protecteurs, (ii) par la présence du zinc comme cofacteur métallique et (iii) par une spécificité de substrats « originale » vis-à-vis de substrats non naturels. En particulier les PDFs mitochondriales sont les premières PDFs à zinc (Zn-PDF) actives à être caractérisées. Enfin, les PDFs de plantes ont révélé *in vitro* une activité particulièrement sensible à l'actinonine, un antibiotique ayant pour cible *in vitro* et *in vivo* les PDFs bactériennes.

De par sa grande affinité (de l'ordre du nanomolaire) et sa haute spécificité pour les PDFs de plantes *in vitro*, l'actinonine représente un outil d'investigation puissant pour l'étude *in vivo* du rôle de la NME dans les organites. C'est pourquoi nous avons fait pousser des plantules d'*A. thaliana* dans des milieux contenant différentes concentrations d'actinonine. Les plantules développent alors un phénotype albinos caractérisé par un blanchiment important de leurs feuilles et de leurs cotylédons. L'intensité de ce blanchiment s'est révélée être fonction de la concentration d'inhibiteur dans les milieux. Dans ces conditions et en présence d'une source de carbones réduits (saccharose) qui permet une croissance indépendante de la photosynthèse, les plantules sont capables de croître et de se développer. En revanche, en l'absence de saccharose la croissance des plantules s'arrête rapidement et brutalement. L'ensemble de ces résultats nous indique que l'actinonine est capable de bloquer la fonction photosynthétique et nous suggère d'une part que sa cible principale est *in vivo* la PDF chloroplastique et d'autre part que la NME jouerait un rôle essentiel dans le mécanisme photosynthétique.

L'absence d'identification de NME mitochondriale chez la levure et le ver ainsi que la faible caractérisation du protéome mitochondrial des mammifères avaient conduit à ériger en dogme l'hypothèse de l'inexistence de NME mitochondriale chez les eucaryotes supérieurs. Mais la caractérisation d'un mécanisme de la NME spécifiquement localisé dans les mitochondries des plantes supérieures pourrait remettre en cause ce dogme. Afin de savoir s'il existe aussi un tel mécanisme dans les mitochondries animales nous avons recherché dans les génomes d'animaux la présence de séquences codant pour des homologues des PDFs et MAP1s d'organites de plantes. De telles séquences homologues ont pu être identifiées à travers tout le monde animal (cnidaires, insectes, oiseaux, poissons, amphibiens et mammifères). Les séquences codant les homologues des PDF1As et MAP1Ds de l'homme ont été clonées au laboratoire.

Afin de savoir si les homologues humaines sont impliquées dans la NME mitochondriale, nous avons entrepris leur caractérisation cellulaire et biochimique. Comme chez les formes de plantes l'extension N-terminale correspond à la séquence d'adressage vers les organites, nous avons fusionné l'extension N-terminale de la PDF1A (*HsPDF*) et de la MAP1D (*HsMAP1D*) humaines avec la protéine fluorescente verte (GFP). Ces constructions ont ensuite été exprimées de façon transitoire dans des systèmes eucaryotes hétérologue et homologue. Dans les deux cas, y compris dans les cellules humaines, *HsPDF* et *HsMAP1D* sont spécifiquement exportées vers les mitochondries. De plus grâce à des anticorps obtenus par immunisation de lapins avec *HsPDF* purifiée nous avons pu détecter l'expression de la PDF dans des extraits cellulaires humains et simiens. A l'instar des PDFs de plantes, les formes mammifères détectées *in vivo* correspondent aussi à une forme maturée qui a probablement perdu son extrémité N-terminale lors de la pénétration dans la mitochondrie. L'ensemble de ces résultats prouve clairement qu'il existe aussi chez les animaux une machinerie cellulaire dédiée spécifiquement à l'excision de la méthionine initiateur des protéines synthétisées dans les mitochondries.

Dans le but de caractériser *in vivo* et *in vitro* l'activité déformylase de la PDF humaine, des tests de complémentation génétique ont été entrepris à l'aide d'une souche bactérienne présentant une expression conditionnelle de son gène *def*. Les bactéries exprimant la séquence *HsPDF* sont alors capables de se développer dans des conditions non permissives démontrant ainsi que la PDF humaine possède une activité déformylase *in vivo*. Bien que reliée phylogénétiquement aux PDFs

mitochondriales de plantes, la PDF humaine présente *in vitro* des caractéristiques biochimiques très similaires à celles des PDF1Bs : (i) une activité faible, instable et dépendante de l'addition d'agents protecteurs, (ii) le métal ferreux comme cofacteur métallique et (iii) certaines caractéristiques de sa spécificité de substrat. Enfin à l'instar de toutes les PDFs, la forme humaine a révélé *in vitro* une activité très sensible à l'actinonine.

La comparaison des séquences des PDFs animales avec celles de leurs homologues bactériens et végétaux fait apparaître chez les formes animales la présence de nombreuses substitutions dans des motifs qui sont strictement conservés chez toutes les PDFs. En particulier les PDFs animales présentent systématiquement une substitution au niveau d'un résidu-clef qui est impliqué dans le site actif des PDFs dans des fonctions catalytiques et structurales majeures. En remplaçant ces résidus par leurs pendants des plantes, il est possible de « végétaliser » l'activité de la PDF humaine : en effet, dans ces conditions l'activité de la forme humaine adopte le comportement de l'activité des PDFs mitochondriales de plantes (activité élevée, stable et indépendante de l'addition d'agents protecteurs ainsi que le zinc comme cofacteur métallique). De même si on remplace ces résidus du site actif des PDF1As de plantes par leurs équivalents humains, on « humanise » l'activité des PDF1As de plantes (activité faible, instable et dépendante de la présence d'agents protecteurs). Ces résultats montrent qu'un nombre très restreint de résidus sont responsables du comportement différentiel de l'activité entre les PDFs mitochondriales humaine et végétales.

Ce travail révèle ainsi pour la première fois l'existence d'une voie de la NME dans les mitochondries et les plastides. Ainsi le mécanisme de la NME correspond à un processus universel puisqu'il a été identifié dans tous les compartiments cellulaires où la synthèse des protéines a lieu (procaryote, cytosol eucaryote et organites). De plus dans chacun de ces compartiments la NME assure une fonction essentielle. C'est pourquoi, bien que le rôle de la NME dans les mitochondries reste à l'heure actuelle encore peu clair, nous suspectons fortement ce mécanisme d'y être aussi impliqué dans une fonction majeure. Pour cette raison et (i) parce qu'il existe une PDF humaine exprimée dans les mitochondries et (ii) parce qu'elle présente *in vitro* une activité déformylase très sensible à l'actinonine, le statut des PDFs bactériennes comme cible thérapeutique aurait pu être remis en cause. Néanmoins le confinement de la PDF humaine dans les mitochondries (ce qui devrait la rendre *in vivo* peu accessible aux drogues) ainsi que la possibilité d'exploiter les différences de spécificité de substrat entre les PDF humaine et bactériennes (afin d'améliorer la sélectivité des inhibiteurs de PDFs bactériennes) nous permettent de confirmer que les PDFs bactériennes restent des cibles originales pour de nouveaux antibiotiques. Enfin l'identification d'un homologue des PDF1Bs chez *Plasmodium falciparum*, l'agent responsable de la malaria, augmente considérablement l'intérêt thérapeutique porté sur les PDFs et permet d'envisager la conception d'inhibiteurs de PDFs à effets antibactériens et antipaludiques.