



HAL
open science

Approche structurale des interactions hôtes-pathogènes : Cas de facteurs de virulence et toxines bactériennes

Pauline Macheboeuf

► To cite this version:

Pauline Macheboeuf. Approche structurale des interactions hôtes-pathogènes: Cas de facteurs de virulence et toxines bactériennes. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Grenoble Alpes, 2022. tel-03820758

HAL Id: tel-03820758

<https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-03820758v1>

Submitted on 19 Oct 2022

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

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

Approche structurale des interactions hôtes- pathogènes : Cas de facteurs de virulence et toxines bactériennes

Mémoire en vue d'obtenir l'Habilitation à Diriger des Recherches

École doctorale Chimie et Sciences du vivant

Université Grenoble Alpes

Pauline Macheboeuf

Groupe Pathogénie bactérienne

Institut de Biologie Structurale (IBS)

Présentée et soutenue publiquement le 7 octobre 2022 devant le jury composé de :

Dr Olivera FRANCTIC, rapportrice

Dr Anne IMBERTY, rapportrice

Dr Lionel MOUREY, rapporteur

Dr Ina ATTREE-DELIC, examinatrice

Dr Laurent TERRADOT, examinateur

Remerciements

En mémoire de mon directeur de thèse Otto Dideberg, disparu cette année.

Merci à Andréa Dessen qui est ma source d'inspiration au quotidien. Merci d'avoir toujours cru en moi pendant toutes ces années.

Je remercie mes collègues et les étudiants que j'encadre, auprès de qui j'apprends tous les jours et qui me font grandir.

Un énorme merci à mes parents qui m'ont toujours poussée à accomplir mes rêves en me donnant les moyens de les accomplir.

A Paul et Sacha, mes deux soleils, sans qui la vie ne serait pas si belle.

TABLE DES MATIÈRES

<i>Introduction</i>	7
<i>I. Synthèse des activités de recherche</i>	8
<i>I.1 Thèse de doctorat</i>	8
<i>I.2 Recherches postdoctorales</i>	12
<i>I.2.1 Études des interactions entre la protéine de virulence M1 de Streptococcus pyogenes avec le fibrinogène humain et son lien avec le syndrome du choc toxique</i>	12
<i>I.2.2 Études de l'Anaphase Promotting Complex APC en complexe avec la protéine Gag du virus HIV et son rôle dans la régulation du cycle cellulaire</i>	17
<i>I.3 Recherches en tant que chargée de recherche CNRS</i>	18
<i>I.3.1 Études des protéines ESCRT</i>	18
<i>I.3.2 Les facteurs de restriction</i>	24
<i>I.3.2.1 Projet IFITM3</i>	24
<i>I.3.2.2 Projet Viperin</i>	25
<i>I.3.2.3 Projet macroglobulin</i>	28
<i>I.3.2.4 Projet colibactine</i>	30
<i>II. Projets de recherche</i>	31
<i>II.1 Biosynthèse des peptides non ribosomiaux et polycétides par des assemblages multi-domaines</i>	31
<i>II.2 Les méga-enzymes NRPS</i>	32
<i>II.3 Les méga-enzymes PKS</i>	34
<i>II.4 Les hybrides NRPS/PKS</i>	37
<i>II.5 Projet colibactine</i>	38
<i>II.5.1 Le rôle de la colibactine au sein du microbiote intestinale</i>	38
<i>II.5.2 Études structurales des protéines Clb</i>	40
<i>II.5.2.1 ClbK</i>	40
<i>II.5.2.2 ClbB</i>	46
<i>II.5.2.3 ClbN</i>	47
<i>II.5.2.4 Objectif opéron Clb entier</i>	48
<i>II.6 Projet NRPS Pseudomonas</i>	50
<i>Curriculum Vitae</i>	53
<i>Références</i>	59

Introduction

Ce manuscrit a pour but de retracer mes expériences de recherche depuis la thèse jusqu'aux projets de recherche que je mène depuis mon recrutement en tant que chercheur au CNRS en 2011. J'ai effectué la quasi-totalité de mon parcours académique à Grenoble avec une incursion aux États-Unis pour un stage postdoctoral de deux ans et demi après la thèse. Mon parcours scientifique a également été assez linéaire puisque je m'intéresse depuis maintenant près de 20 ans à la biologie structurale des molécules d'intérêt biomédical. Les sujets biologiques ont quelque peu varié en fonction des postes que j'ai occupés, en passant par l'étude de protéines bactériennes ou bien des protéines humaines impliquées dans la restriction de virus pathogènes. Dans tous les cas, mon intérêt pour les interactions entre le pathogène et son hôte m'a conduit à graduellement augmenter la taille des protéines ou des complexes que j'ai étudiés m'amenant à explorer différentes techniques de biologie structurale en commençant par la cristallographie des rayons X, la diffusion des rayons X aux petits angles et maintenant la microscopie électronique que j'espère utiliser de plus en plus dans les années à venir.

I. Synthèse des activités de recherche

Mes activités de recherche se divisent en trois parties, à savoir mon travail de thèse à l'Institut de Biologie Structurale (IBS) de Grenoble de 2003 à 2006, mes recherches postdoctorales à la fois aux États-Unis et en France de 2007 à 2011 et enfin mes travaux de recherche depuis mon recrutement au CNRS en octobre 2011 dans les laboratoires UVHCI (Unit of Virus and Host Cell Interactions) puis IBS du Pr. Winfried Weissenhorn et celui du Dr Andréa Dessen à l'IBS.

I.1 Thèse de doctorat

Date : 1^{er} octobre 2003 au 6 novembre 2006

Lieu : Laboratoire de Cristallographie Macromoléculaire (LCM), IBS Grenoble.

Directeurs de thèse : Dr. Otto Dideberg et Dr. Andréa Dessen

Sujet de thèse : Caractérisation structurale et fonctionnelle de PBP1b de *Streptococcus pneumoniae* et son implication dans la découverte de nouveaux inhibiteurs.

Streptococcus pneumoniae, pathogène majeur de la sphère oro-pharyngée, résiste fréquemment aux antibiotiques de la famille des β -lactamines généralement administrés dans le cas d'infections associées à ce pathogène. Les cibles de ces antibiotiques sont les enzymes responsables de la biosynthèse du peptidoglycane bactérien, les Penicillin-Binding Proteins (PBP) dont la structure du site actif est modifiée dans le cas de souches résistantes aux antibiotiques.

Lors de mon travail de thèse, je me suis intéressée aux PBP de *Streptococcus pneumoniae*, et en particulier aux PBP bifonctionnelles ou de classe A. Celles-ci sont composées d'un domaine transpeptidase (TP) inhibé par les antibiotiques de la famille des β -lactamines et d'un domaine glycosyltransférase (GT), considéré comme une nouvelle cible thérapeutique. Parmi les trois PBP de classe A de *S. pneumoniae*, PBP1b a été choisie en raison de la solubilité de sa partie périplasmique (Di Guilmi et al., 2003). Elle constituait alors le meilleur espoir de déterminer, pour la première fois, la structure d'une PBP bifonctionnelle, et en particulier d'un domaine glycosyltransférase (GT).

Le premier objectif de ce travail de thèse était de résoudre la structure du domaine périplasmique contenant les domaines TP et GT de PBP1b de *S. pneumoniae*. Les premières tentatives de cristallisation de la forme périplasmique entière avaient été initiées en 1999 au laboratoire, mais sans succès. Nous avons initié une nouvelle approche consistant en l'étude séparée des domaines catalytiques de cette protéine. Cette approche s'est révélée fructueuse puisque j'ai pu résoudre la structure du domaine TP de PBP1b à haute résolution par cristallographie aux rayons X. Nous avons ainsi mis en évidence un phénomène de réorganisation structurale du site actif en fonction de son interaction avec un pseudo-substrat de la réaction. Ce résultat nous a permis de proposer que l'ouverture du site actif joue un rôle clé lors du processus de division cellulaire (Figure 1) (Macheboeuf et al., 2005, 2008).

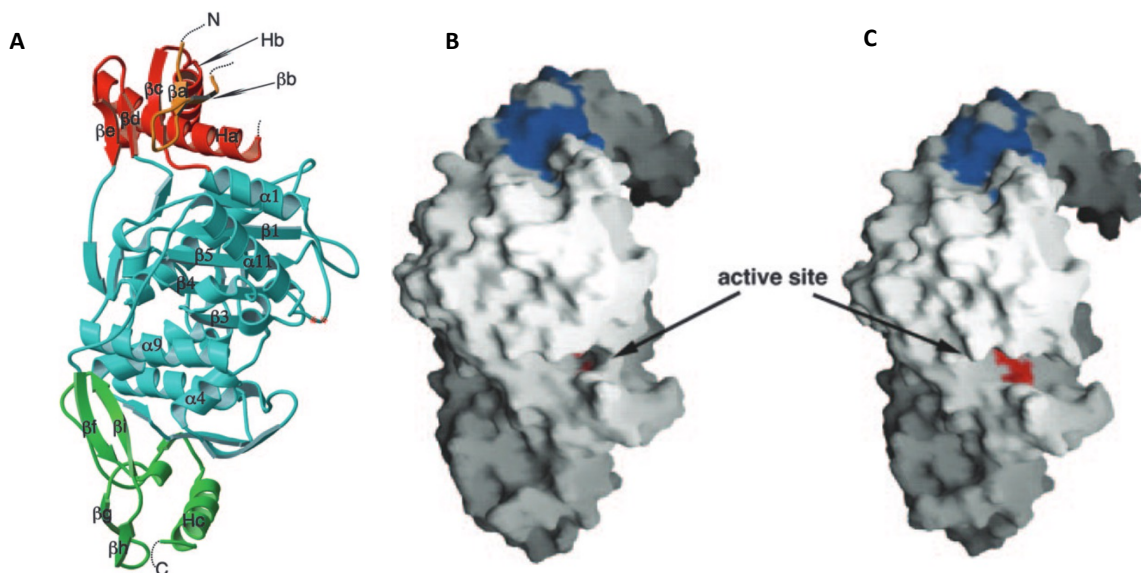


Figure 1 : (A) Structure cristallographique de PBP1b comprenant le domaine transpeptidase et un brin issu du domaine glycosyltransferase (en orange). (B) Site actif fermé en l'absence de substrat et (C) ouverture du site actif en présence de substrat. Reproduit de (Macheboeuf et al., 2005)

À plus long terme, ce travail s'inscrivait dans une thématique de découverte de nouvelles molécules-médicaments. En effet, la menace grandissante de la résistance du pneumocoque à la plupart des antibiotiques utilisés en antibiothérapie pose le problème du développement constant de nouvelles molécules inhibitrices. Dans ce cadre, et malgré le fait que PBP1b ne soit pas impliquée dans les processus de développement de la résistance (Du Plessis et al., 2000), une structure de domaine transpeptidase de PBP de classe A nous

permettait d'étendre nos connaissances concernant les interactions du site actif avec des molécules inhibitrices. Ces informations sont cruciales dans le processus de synthèse de nouveaux ligands susceptibles d'agir comme de nouveaux antibiotiques. J'ai ainsi résolu la structure de nombreux complexes entre PBP1b et des inhibiteurs de natures variées, certains de structure chimique connue, la nitrocéfine et la céfotaxime, jusqu'à de nouvelles molécules de type β -lactame et γ -lactame en collaboration avec les laboratoires de Rex Pratt de l'Université de Wesleyan (USA) et Chris J. Schofield au Chemistry Research Laboratory à Oxford (Royaume-Uni). En particulier, nous avons déterminé la première structure d'un complexe entre une PBP et une molécule de type γ -lactame, molécule qui représente un sérieux espoir pour le développement de nouveaux médicaments. Nous avons déterminé à la fois les structures des complexes covalents entre PBP1b et ces molécules (Figure 2), les concentrations minimales inhibitrices sur différentes souches de pneumocoque avec différents degrés de résistance et les paramètres cinétiques d'acylation de PBP1b par spectrométrie de masse et spectrofluorométrie par mélange rapide (Macheboeuf et al., 2007).

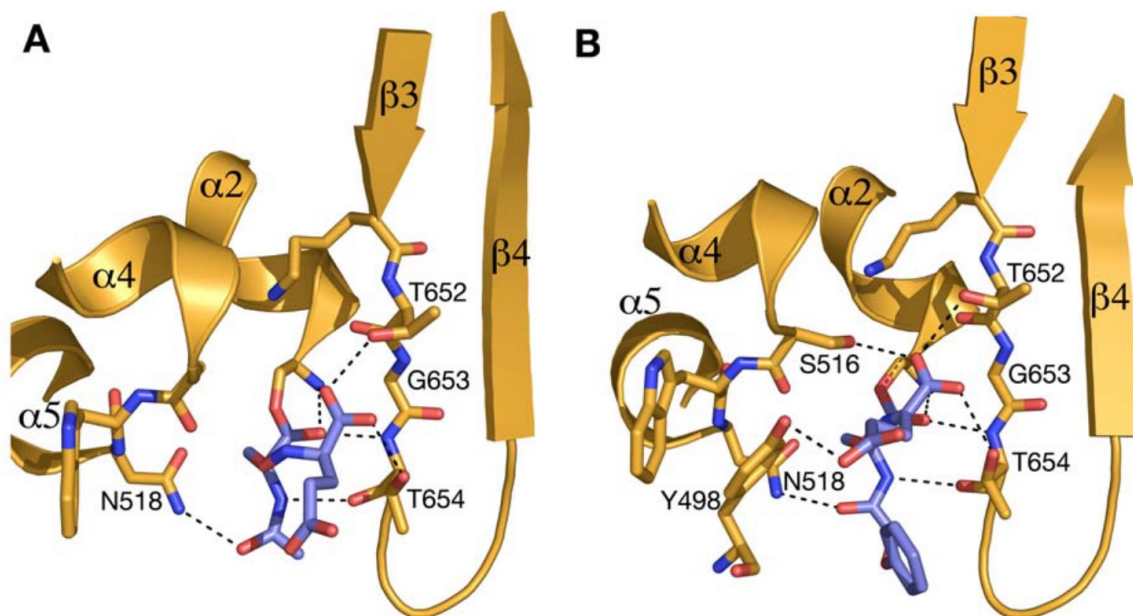


Figure 2 : Représentation schématique de la lactivicine (A) et de la molécule TB-3-48 (B) dans le site actif de PBP1b.

Le troisième objectif concernait l'étude structurale du domaine glycosyltransférase de PBP1b. Aucune donnée structurale d'un domaine GT de PBP, ou même de glycosyltransférase

monofonctionnelle n'était disponible à l'époque, ce qui laissait augurer de la difficulté du travail. Les nombreuses tentatives infructueuses de purification et de solubilisation de ces domaines chez de nombreux organismes laissent ouverte la question du bon repliement de cette région. Elle est pourtant de toute première importance dans l'optique de développer de nouveaux antibiotiques. J'ai donc initié des études de diffusion de rayons X aux petits angles (SAXS) en collaboration avec le Dr. Patrice Vachette de l'Institut de Biochimie Moléculaire et Cellulaire (IBBMC) de l'Université Paris-XI à Orsay. Cette approche nous a permis de proposer un modèle d'organisation et de repliement du domaine glycosyltransférase au sein des PBP (Figure 3) (Macheboeuf et al., 2011a) qui, par la suite, a été confirmé par les structures cristallographiques des domaines GT de *S. aureus* (Lovering et al., 2007) et *A. aeolicus* (Yuan et al., 2007).

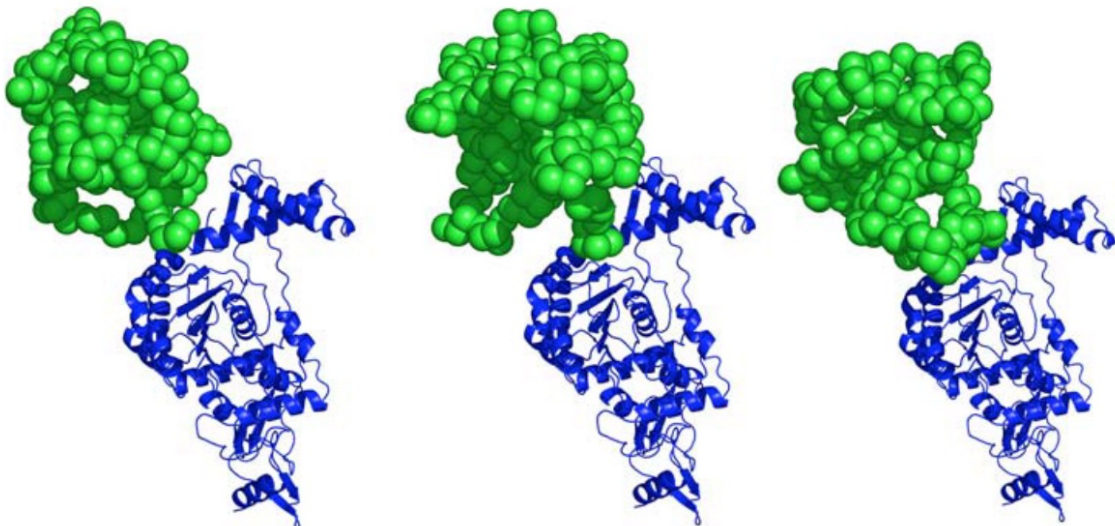


Figure 3 : Trois modèles de PBP1b entière obtenus par SAXS et modélisés avec le programme BUNCH

I.2 Recherches postdoctorales

I.2.1 Études des interactions entre la protéine de virulence M1 de *Streptococcus pyogenes* avec le fibrinogène humain et son lien avec le syndrome du choc toxique

Date : 1^{er} février 2007 au 6 novembre 2009

Lieu : Laboratoire du Pr Partho Ghosh à l'Université de Californie San Diego, USA.

Au cours de ce premier stage postdoctoral, mon but était de rester dans la thématique de la virulence bactérienne en perfectionnant les techniques de biologie structurale acquises pendant ma thèse. Je voulais également développer une approche d'interactions hôte-pathogène et développer des techniques de caractérisations structurales de complexes protéiques. En intégrant le laboratoire du Pr. Partho Ghosh à l'Université de Californie de San Diego (USA), je me suis intéressée à l'étude du facteur de virulence M1 de l'organisme *Streptococcus pyogenes*, bactérie responsable d'infections graves comme le syndrome du choc toxique, la fasciite nécrosante ou les rhumatismes articulaires aigus, et d'infections moins sévères comme la pharyngite, l'impétigo ou la scarlatine. En particulier, le syndrome du choc toxique streptococcique (SCTS) se caractérise par une vasodilatation et l'altération de la barrière endothéliale sous l'effet de la production de la protéine HBP (Heparin Binding Protein) par les neutrophiles. S'ensuit une fuite importante de plasma sanguin qui entraîne la défaillance de plusieurs organes.

Afin de comprendre le mécanisme moléculaire du SCTS et pouvoir envisager de nouvelles pistes vaccinales, j'ai initié une étude structurale du complexe entre la protéine M1 de *S. pyogenes* et le fibrinogène humain. J'ai ainsi résolu la structure cristallographique à 3.3 Å de résolution du complexe de 380 kDa contenant le fragment M1^{BC1} de la protéine M1 et le fragment FgD du fibrinogène humain. Le fragment M1^{BC1} englobe notamment les motifs B1 et B2 responsables de l'accroche au fibrinogène. Le FgD du fibrinogène quant à lui, comprend deux têtes globulaires responsables de l'interaction avec les intégrines $\beta 2$. La structure du complexe présente globalement une organisation en croix avec quatre molécules de FgD entourant un dimère de M1^{BC1}, lui-même organisé en double hélice (Figure 4). Cela s'accorde bien avec la présence de $2 \times 2 = 4$ motifs B sur le dimère de M1. La répétition B1 fixe 2

molécules de FgD orientées à 180° ; il en est de même pour le motif B2. Comme B1 et B2 sont situés sur M1^{BC1} à un quart de tour d'hélice l'un de l'autre, les deux paires de FgD sont positionnées à angle droit et forment une croix.

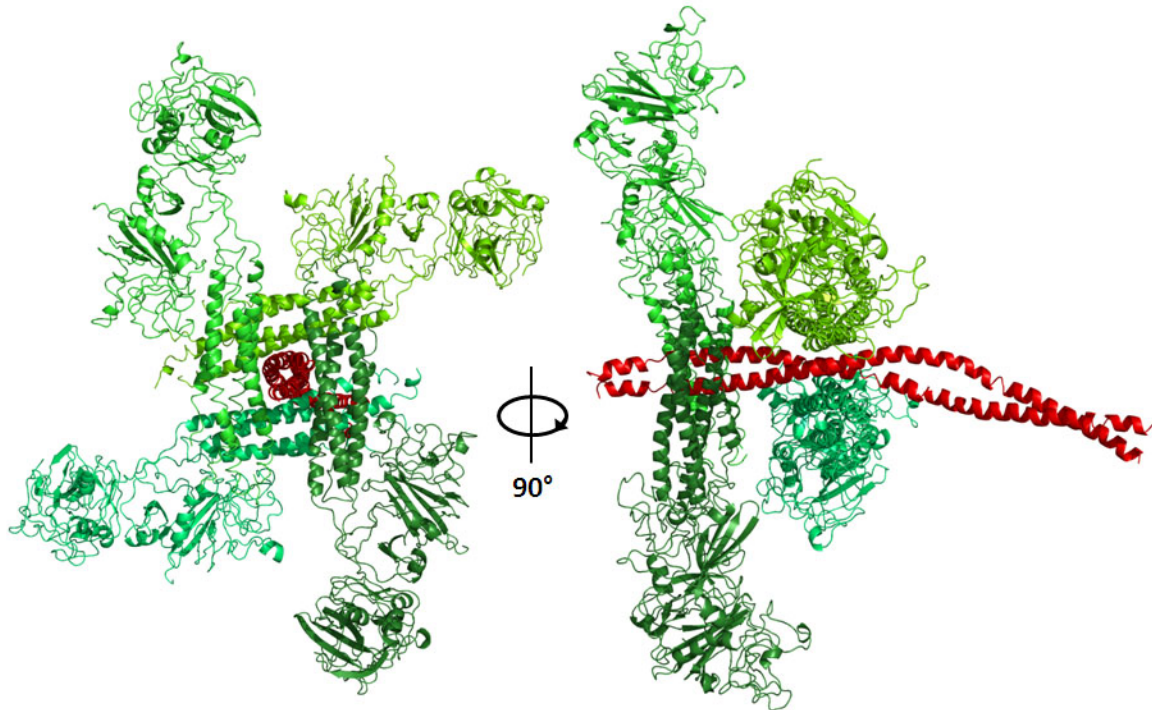


Figure 4 : Structure cristallographique du complexe entre la protéine M1 (rouge) de *Streptococcus pyogenes* et le FgD issu du fibrinogène humain (vert). Reproduit de Macheboeuf et al, 2011, *Med Sci*.

Dans un deuxième temps, j'ai modélisé l'interaction entre les protéines M1 et fibrinogène (Fg) entières en utilisant la structure résolue précédemment, la structure du Fg entier et un modèle de la protéine M1 entière. Le modèle obtenu constitue un réseau tridimensionnel contenant des piliers de Fg articulés autour de nœuds de M1 (Figure 5A), organisation que j'ai vérifiée par microscopie électronique (Figure 5B) et qui nous a permis, par la suite, de comprendre le mécanisme d'activation des neutrophiles. En effet, nous avons postulé que la formation du complexe M1-Fg devait induire la réticulation des intégrines en surface des neutrophiles, induisant leur activation et le relargage de HBP. Afin de tester cette hypothèse, j'ai construit des mutants de délétion de la protéine M1 (Figure 5G) et mesuré leur effet sur la sécrétion de HBP par les neutrophiles. Les premiers mutants de délétion qui suppriment tour à tour une des deux répétition B1 et B2 responsables de l'accroche au fibrinogène (mutants $\Delta B1$ et $\Delta B2$, Figure 5G) ont été modélisé sous la forme de fibres (Figure 5C) que j'ai également pu visualiser par microscopie électronique (Figure 5D). Ces fibres,

lorsque mises en contact avec des neutrophiles humains, n'ont pas permis l'activation de ces derniers puisqu'aucune sécrétion de HBP n'a pu être détectée (Figure 5H). J'ai également examiné l'influence de la densité de l'agrégat sur l'activation des neutrophiles. Pour cela, j'ai construit un mutant de M1 dont la répétition B2 amino-terminale a été supprimée puis réinsérée en position carboxy-terminale de la molécule (mutant B2C, Figure 5G) pour augmenter l'espace entre les deux répétitions B. Le modèle d'agrégat ainsi généré montre une organisation moins dense que pour la protéine native (Figure 5E et F) qui n'induit pas non plus la sécrétion de HBP (Figure 5H) suggérant que la densité de l'agrégat est également cruciale pour l'activation des neutrophiles.

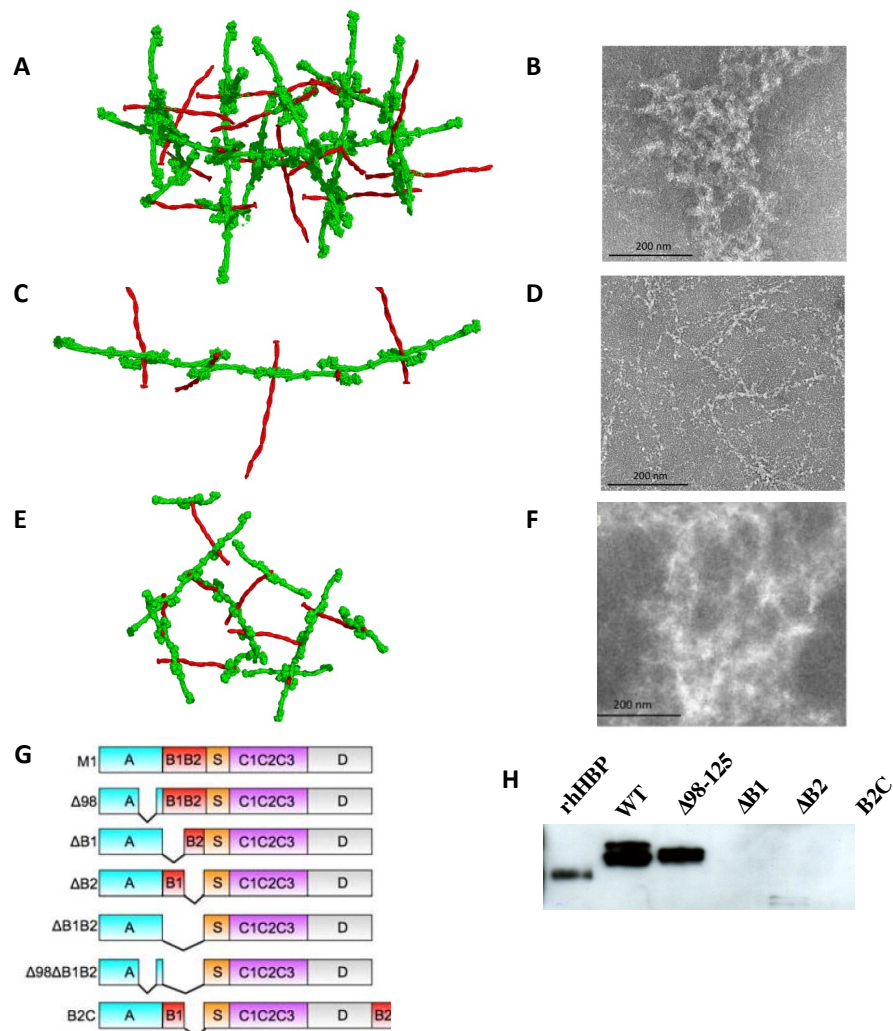


Figure 5 : (A) Modèle d'agrégat M1-Fg entre la protéine M1 (rouge) et le fibrinogène humain (vert). (B) Cliché de microscopie électronique de l'agrégat M1-Fg natif. (C) Modèle d'agrégat entre le fibrinogène humain et les mutants $\Delta B1$ ou $\Delta B2$. (D) Cliché de microscopie électronique de l'agrégat correspondant. (E) Modèle d'agrégat entre le fibrinogène humain et le mutant B2C. (F) Cliché de

microscopie électronique de l'agrégat correspondant. (G) Schéma des différents mutants de la protéine M1 réalisés. (H) Visualisation par Western Blot de la sécrétion de HBP par les neutrophiles mis en présence des différents mutants de M1, en utilisant des anticorps anti-HBP. La ligne rhHBP correspond au contrôle positif de la protéine HBP recombinante. Adapté de Macheboeuf et al, 2011, Med Sci. et Macheboeuf et al, 2011, Nature.

Grâce à cette série d'expériences nous avons pu montrer que, au cours d'une infection par le pathogène *S. pyogenes*, M1 et le fibrinogène interagissent et forment des agrégats qui sont reconnus par les intégrines $\beta 2$ à la surface des neutrophiles, permettant à ces derniers d'agrégér à leur tour et d'activer la sécrétion de Heparin Binding Protein (HBP), un fort vasodilatateur. Ceci entraîne enfin une fuite importante de plasma sanguin et une défaillance simultanée de plusieurs organes, caractéristiques du syndrome du choc toxique (Figure 6). Nous avons démontré que non seulement la présence mais également l'architecture de ces agrégats était cruciale dans l'activation des neutrophiles et nous avons ainsi proposé un mécanisme expliquant le processus d'infection de la bactérie et le détournement du système immunitaire inné de l'hôte (Macheboeuf et al., 2011b; Macheboeuf and Ghosh, 2011; McNamara et al., 2008).

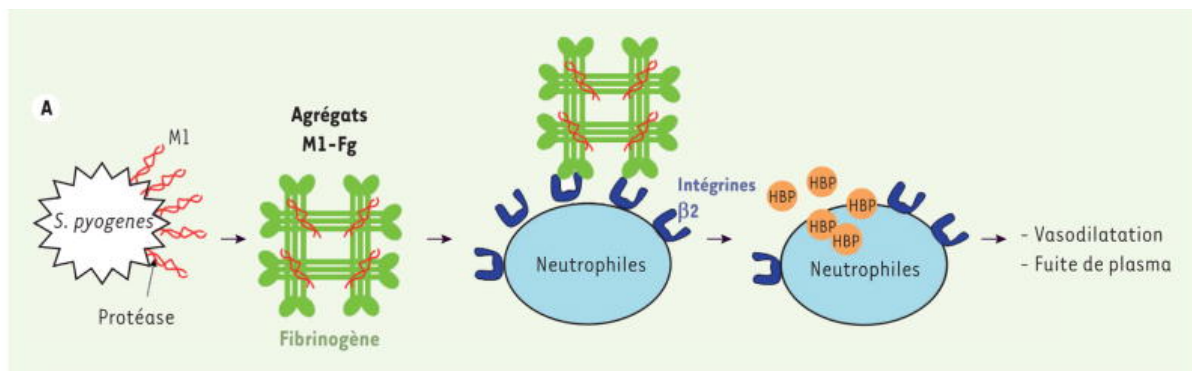


Figure 6 La protéine M1 (rouge) est sécrétée dans la circulation sanguine où elle interagit avec le fibrinogène de l'hôte (vert) pour former un agrégat amorphe qui sera par la suite reconnu par les récepteurs intégrines $\beta 2$ en surface des neutrophiles. Ces neutrophiles activés sécrètent une protéine à fort potentiel vasodilatateur, l'Heparin Binding Protein (HBP, orange). Reproduit de Macheboeuf et al, 2011, Med Sci.

Cette expérience postdoctorale m'a permis, à la fois de compléter et d'approfondir mes connaissances en cristallographie des protéines et en biochimie structurale, mais également de développer des compétences dans la formation et la caractérisation de complexes protéiques à haut poids moléculaire. J'ai également pu me confronter à la

microscopie électronique afin de caractériser des assemblages protéiques gigantesques tels que les réseaux de fibrinogène. Pour cette partie du projet, j'ai collaboré avec le laboratoire de John Johnson du Scripps Institute de San Diego qui possède une expertise reconnue dans ce domaine. J'ai participé à toutes les étapes qui ont mené à la visualisation des différentes architectures d'agrégats entre la protéine M1 et le fibrinogène, résultats qui m'ont permis *in fine* de prouver l'exactitude de mes hypothèses sur le mode d'interaction entre le facteur de virulence et son hôte.

I.2.2 Études de l'Anaphase Promoting Complex APC en complexe avec la protéine Gag du virus HIV et son rôle dans la régulation du cycle cellulaire

Date : 1^{er} février 2010 au 1^{er} février 2012

Lieu : Unité des Interactions entre Virus et Cellules Hôtes (UVHCI) Grenoble. Équipe du Pr. Winfried Weissenhorn

Mon retour en France pour un deuxième stage postdoctoral s'est effectué grâce à l'obtention d'une bourse de la fondation pour la recherche médicale (FRM) et m'a permis d'intégrer le laboratoire du Pr. Winfried Weissenhorn au sein de l'Unité des Interactions entre Virus et Cellules Hôtes (UVHCI) de Grenoble. Je souhaitais, en intégrant ce laboratoire, approfondir mes connaissances sur la caractérisation biophysique et structurale de complexes protéiques impliqués dans l'interaction hôte-pathogène, tout en changeant de domaine d'expertise puisque je me tournais alors vers les virus et leurs interactions avec les protéines humaines.

Le sujet qui m'a été proposé impliquait une collaboration avec l'équipe de D. Gerlier à l'université Lyon 1 qui avait identifié le complexe eucaryote promouvant l'anaphase (Anaphase Promoting Complex, APC) comme étant le partenaire de Pr55^{Gag} du virus HIV-1. Les détails de l'interaction se situaient au niveau de la sous-unité APC2 de l'APC et de la protéine p17^{MA} de la matrice du VIH. L'APC est un complexe multimérique essentiel à la régulation du cycle cellulaire. Il avait été montré que la sous-unité APC2 agissait directement sur le cycle viral du VIH en inhibant le bourgeonnement du virus de façon dominante négative sans modification du cycle cellulaire. Pour tenter de comprendre les mécanismes d'interaction entre APC2 et P17^{MA}, ce second stage postdoctoral consistait en la résolution de la structure de ce complexe afin d'élucider le rôle d'APC2 lors du cycle viral et de développer une nouvelle classe de molécules antivirales. Malheureusement, malgré tous les efforts consentis sur ce projet, nous n'avons jamais pu montrer d'interaction entre ces deux protéines, nous obligeant à abandonner le projet.

Cependant, malgré les résultats infructueux de ce projet, j'ai pu enrichir mon arsenal de techniques biochimiques avec les expressions de protéines en milieu eucaryote, outils qui se sont avérés indispensables par la suite.

I.3 Recherches en tant que chargée de recherche CNRS

A partir du 1^{er} octobre 2011, j'ai été recrutée au CNRS et affectée à l'UMI 3265, dans le laboratoire UVHCI (unit of Virus and Host Cell Interactions) dirigé par le Dr. Stephen Cusack et codirigé par le Pr. Rob Ruigrok. Au sein de ce laboratoire, j'ai intégré l'équipe du Pr. Winfried Weissenhorn dans lequel j'avais effectué un stage postdoctoral depuis le 1^{er} février 2010 ; mon intégration s'est donc déroulée dans les meilleures conditions.

Les thématiques développées dans le laboratoire consistaient à étudier les mécanismes d'entrée et de bourgeonnement des virus enveloppés et en particulier du virus VIH. Le laboratoire s'intéresse également aux mécanismes de défense de l'organisme hôte contre ces virus enveloppés grâce à la production de facteurs de restriction. Mon expertise dans la caractérisation de facteurs de virulence et leurs interactions avec la cellule hôte m'ont permis de m'intégrer idéalement dans les thématiques du groupe et de commencer à développer une thématique propre.

Mes activités de recherche se sont articulées autour de 2 axes principaux :

- La caractérisation du complexe ESCRT humain et sa régulation pour comprendre son implication dans les processus cellulaires tels que le bourgeonnement viral, la cytokinèse et le transport endosomal.
- La caractérisation de facteurs de restriction humains contre la prolifération de virus pathogènes.

I.3.1 Études des protéines ESCRT

Date : 1^{er} octobre 2011-Novembre 2018

Lieu : Unité des Interactions entre Virus et Cellules Hôtes (UVHCI) Grenoble. Équipe du Pr. Winfried Weissenhorn (laboratoire EBIV).

Le complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), découvert chez la levure, est responsable de la dégradation de protéines de la membrane plasmique, telles que les récepteurs des voies de signalisation intracellulaires. Ces protéines sont incorporées dans des vésicules qui sont ensuite internalisées pour enfin fusionner avec des endosomes. Au niveau de la membrane endosomale, un signal permet de rediriger les récepteurs soit vers la membrane plasmique soit vers un processus de dégradation par les

lysosomes. Dans ce dernier cas, les protéines cibles sont ubiquitinylées par des ubiquitine ligases E3 spécifiques et sont ensuite internalisées dans des vésicules qui bourgeonnent de la membrane endosomale. Ces bourgeons sont appelés vésicules intraluminales (Intralumenal vesicles, ILV) et sont situés à l'intérieur des endosomes, alors appelés des corps multivésiculaires (multivesicular bodies, MVB). Les MVB finissent par fusionner avec les lysosomes et relâcher le contenu de leurs ILV qui sera finalement dégradé par les hydrolases du lysosome. La formation des ILV est dépendante du très large complexe ESCRT, qui est responsable de la reconnaissance des protéines ubiquitinylées au niveau de la membrane des endosomes, de la déformation de cette membrane, de l'invagination des vésicules, du recyclage de l'ubiquitine et enfin de la libération des ILV contenant les protéines cibles.

Le complexe ESCRT est organisé en quatre sous-complexes, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, et ESCRT-III, recrutés séquentiellement au niveau de la membrane endosomale (Figure 7). La capture et la concentration des protéines ubiquitinylées au niveau de la membrane sont réalisées par les complexes ESCRT-0, -I et -II qui possèdent chacun des motifs reconnaissant l'ubiquitine et qui sont ancrés à la membrane endosomale par des interactions lipidiques. Le recrutement du complexe ESCRT-III permet la déformation, l'invagination et la constriction finale de la membrane menant au relargage des vésicules contenant les protéines à dégrader. Finalement, l'AAA ATPase Vps4 permet de recycler les composants du complexe ESCRT-III pour le cycle suivant.

Le complexe ESCRT-III des mammifères est composé de 10 protéines CHMP (Charged Multivesicular body Proteins) : CHMP1 à CHMP6 (CHMP1 et CHMP2 présentant 2 isoformes A et B, CHMP4 en présentant 3, A, B et C) (Howard et al., 2001; Martin-Serrano et al., 2003; von Schwedler et al., 2003) et de 2 protéines CHMP-« like » (CHMP7, IST1) (Horii et al., 2006). ESCRT-III est impliqué dans les dernières étapes de la formation des bourgeons grâce à la formation de polymères de protéines CHMP au niveau de la membrane des endosomes puis par la déformation et la constriction de celle-ci menant à l'expulsion des vésicules. Les protéines CHMP possèdent un arrangement similaire : une région N-terminale basique et une région C-terminale acide auto-inhibitrice qui leur permet de garder une organisation monomérique lorsqu'elles sont dans le cytosol. La région inhibitrice subit une réorganisation structurale lors de l'activation menant à la formation de polymères homo- ou hétéro-peptidiques ancrés au niveau de la membrane grâce à la région basique N-terminale (Lata et al., 2008a).

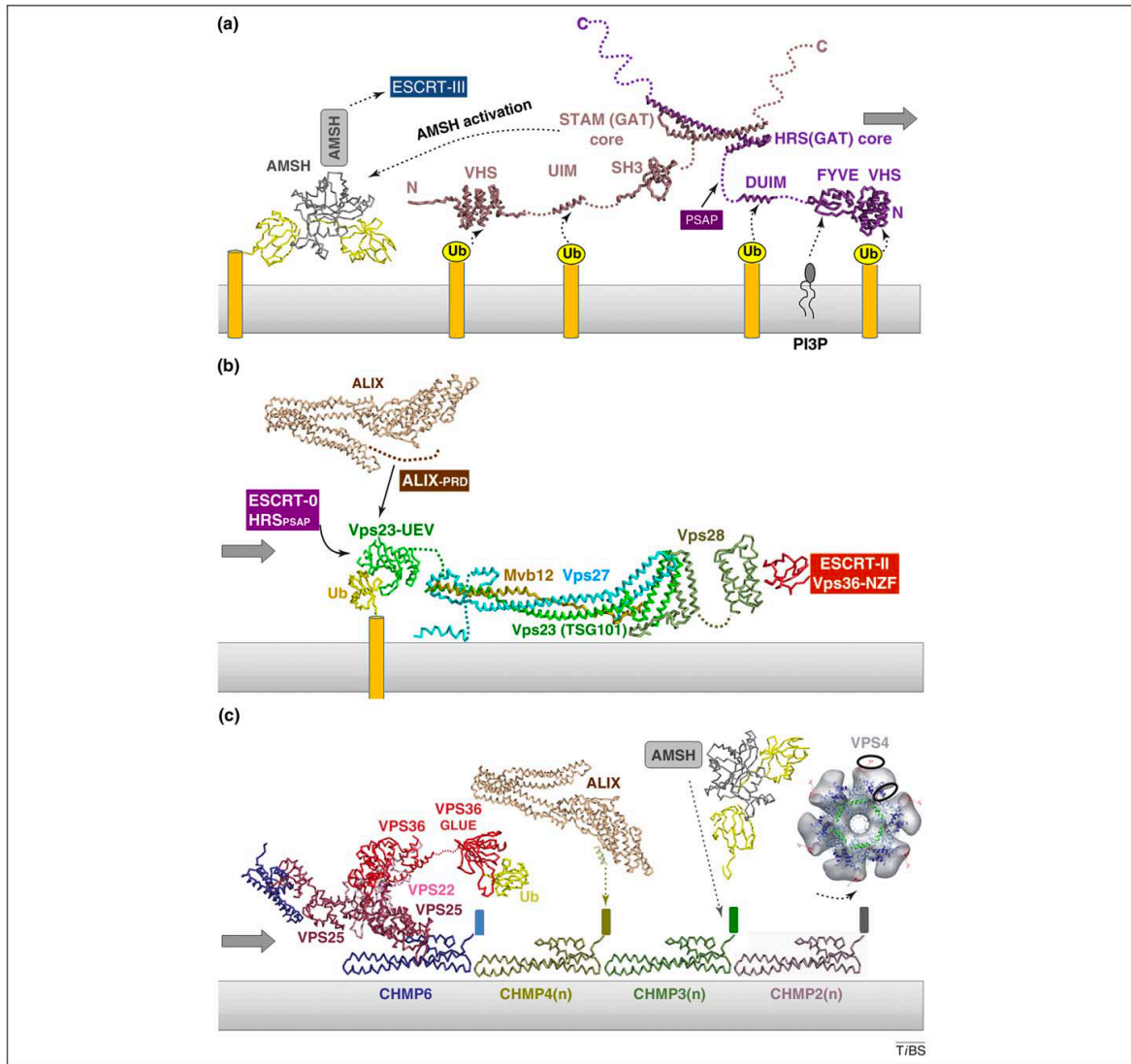


Figure 7 : Modèles structuraux des complexes ESCRT issu de (Peel et al., 2011). Les modèles ont été assemblés grâce aux structures cristallographiques des protéines ESCRT humaines et de levure. (a) complexe ESCRT-0. (b) complexe ESCRT-I. (c) complexe ESCRT-II et ESCRT-III.

Sur le plan structural, la structure cristallographique de CHMP3 résolue dans notre groupe montre une organisation en tonneau hélicale qui semble être conservée dans la famille (Figure 7C). L'organisation de CHMP3 dans le cristal permet de déduire un modèle d'arrangement homo- et hétéro-protéique des protéines CHMP au sein du complexe ESCRT-III (Muziof et al., 2006). Des arrangements homo-protéiques ont été détectés, en particulier pour la protéine CHMP4 qui forme des filaments circulaires qui peuvent être liés grâce à la protéine dimérique ALIX (ALG-2-interacting protein X), un régulateur des complexes ESCRT-I et ESCRT-III (Pires et al., 2009). D'autre part, notre groupe a montré par microscopie électronique que les protéines CHMP2A et CHMP3 formaient un hétéro-polymère hélicale de

40 nm de diamètre qui est dépolymérisé sous l'action de l'AAA ATPase Vps4 en présence d'ATP (Lata et al., 2008b). Une hypothèse montre que CHMP4/6 induit la formation de vésicules alors que le polymère formé de CHMP2/3 catalyse la fission des membranes, réaction requise pour la libération des vésicules (Fabrikant et al., 2009).

Le macrocomplexe ESCRT est également impliqué dans le processus de bourgeonnement du VIH qui détourne le complexe ESCRT-III et l'ATPase Vps4, impliqués dans les dernières étapes de formation des vésicules endosomales, et sont, de ce fait, indispensables au bourgeonnement du VIH et à la cytokinèse (Carlton et al., 2008). En effet, dans le cas du VIH, celui-ci détourne les composantes du système ESCRT pour faciliter la dissémination de ses propres particules infectieuses. Puisque la formation de MVB, la cytokinèse et le bourgeonnement viral sont des processus structurellement similaires impliquant un bourgeonnement en retrait du cytosol et une séparation de membranes, il semble qu'une fonction conservée d'ESCRT-III soit le catalyseur de la scission membranaire (Lata et al., 2009).

Mon projet de recherche a consisté, en particulier, en la caractérisation structurale d'homo- et d'hétéro-polymères des protéines CHMP ainsi qu'en l'étude de leur régulation. Je me suis intéressée aux homo-polymères de CHMP4B, un des facteurs essentiels lors de la déformation membranaire (Hanson et al., 2008; Teis et al., 2008) ainsi qu'aux hétéro-polymères CHMP4-CHMP6. Dans ce cadre, j'ai exploré plusieurs approches pour comprendre la formation de ces polymères tant au niveau structural que fonctionnel. En particulier, j'ai réalisé de nombreux essais de surexpression et de purification de la protéine CHMP4B entière soit en cellules d'insecte infectées par des baculovirus, soit en bactéries, qui ont été abandonnés en raison de sa propension à polymériser au moment de son expression. Dans un deuxième temps, j'ai produit différents fragments de la protéine CHMP4B dans l'espoir de cristalliser un complexe de ces fragments agencés dans une conformation "polymérique", ceci pour comprendre les changements conformationnels occasionnés par la formation de polymères. J'ai enfin exploré une approche dans laquelle j'ai contraint la formation de monomères de CHMP4B par l'introduction de ponts disulfures entre deux hélices de la protéine. Ces expériences m'ont permis de produire une quantité raisonnable de CHMP4B monomérique. Malheureusement les multiples essais de cristallisation sur des protéines entières, tronquées ou chimériques n'ont jamais pu aboutir.

Sur ce sujet, j'ai encadré un étudiant de L3 et j'ai participé à l'encadrement d'une étudiante en thèse Emilie Poudevigne sur la régulation des filaments de CHMP, ce qui m'a permis de co-signer une publication avec cette étudiante (Solomons et al., 2011) et de participer à l'écriture d'une revue (Peel et al., 2011)

Je me suis également intéressée à la régulation des protéines ESCRT, en particulier par le facteur CC2D1A (Coiled-coil- and C2 domain-containing proteins A). Cette protéine est responsable de la régulation transcriptionnelle et est impliquée dans différentes voies de signalisation régulant entre autre, l'immunité, l'inflammation et la survie cellulaire (Chang et al., 2011; Zhao et al., 2010). Des études dans notre laboratoire ont mené à une publication montrant l'importance de CC2D1A dans la régulation de la polymérisation de CHMP4B et son effet dominant négatif sur le bourgeonnement du virus VIH-1 (Martinelli et al., 2012). J'ai mené des expériences de diffusion de lumière aux petits angles afin de déterminer l'enveloppe globale de la protéine. D'autre part, une collaboration avec le groupe de Juan Martin Serrano (King's College London) nous a permis de relier le rôle de l'isoforme CC2D1B à la formation de l'enveloppe nucléaire au moment de la mitose. CC2D1B est ainsi un facteur de régulation essentielle qui détermine la distribution spatio-temporelle des protéines ESCRT responsables de la formation de nouvelles enveloppes nucléaires (Ventimiglia et al., 2018).

J'ai également été impliquée dans un sujet sur un autre facteur de régulation des protéines ESCRT, la protéine Alix. Nolwenn Miguet, technicienne dans notre laboratoire a commencé une thèse depuis 2016, dont je suis co-encadrante. Sa thèse consiste à résoudre la structure tridimensionnelle de la protéine ALIX dimérique afin de comprendre les mécanismes moléculaires de cette dimérisation et son rôle dans le recrutement des facteurs cellulaires impliqués dans le bourgeonnement du VIH. Nolwenn a réussi à purifier la forme dimérique d'ALIX en quantité suffisante pour obtenir des cristaux reproductibles qui ont ensuite été testés à l'ESRF en diffraction. Nous avons pu obtenir un premier jeu de données en 2013 relativement anisotrope dont la résolution atteint 3.5 Å. Les différents essais de remplacement moléculaire, de trempage dans les métaux lourds, les co-cristallisations et d'ajout de nombreux additifs afin d'améliorer la qualité des cristaux ne nous ont jamais permis d'obtenir des phases. Grâce à l'obtention de nanocorps de lama, Nolwenn a très

récemment reproduit des cristaux qui nous ont enfin permis de déterminer la structure d'ALIX à 2.7 Å de résolution. Elle devrait pouvoir soutenir sa thèse fin 2022.

Pour finir, j'ai été impliquée dans un projet de recherche sur l'étude de l'ATPase VPS4 d'archaebactérie en collaboration avec Patricia Renesto, DR2 CNRS dans le laboratoire, qui a focalisé sa recherche sur l'étude des protéines ESCRT d'archaebactéries et en particulier sur la protéine Vps4 de *Metallosphaera sedula*. Nous avons ensemble résolu la structure tridimensionnelle à 3,6 Å de résolution d'un hexamère de vps4. Dans ce travail, nous avons pu montrer que cet arrangement en hexamère était présent en solution et correspondait à la forme catalytiquement active de la protéine. Ces études nous ont permis de confirmer que les interfaces cristallographiques responsables de la formation d'hexamères étaient cruciales dans l'arrangement de la protéines Vps4 humaine et que cet arrangement en hexamère était indispensable dans sa fonction de désassemblage des filaments d'ESCRT au cours du bourgeonnement viral (Figure 8). Ce travail a été publié dans le journal *Nature Communications* en 2015 (Caillat et al., 2015).

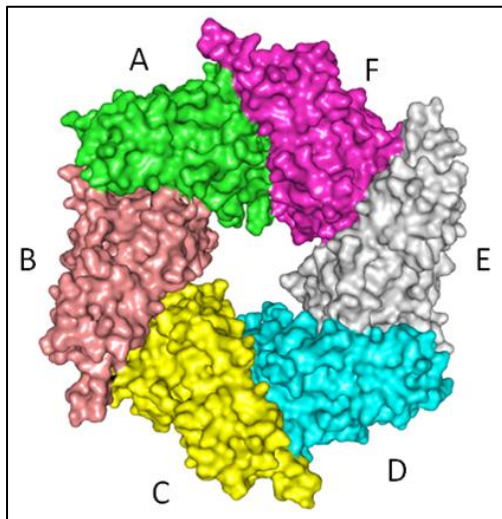


Figure 8 : Structure hexamérique de Vps4 de *Metallosphaera sedula*. Caillat et al, 2015, *Nature Communications*

I.3.2 Les facteurs de restriction

Date : 2013-Novembre 2018

Lieu : Institut de Biologie Structurale (IBS) Grenoble. Équipe du Pr. Winfried Weissenhorn

I.3.2.1 Projet IFITM3

En 2013, le professeur Weissenhorn a débuté une activité de recherche sur le facteur de restriction IFITM3, facteur induit par l'interféron et impliqué dans la restriction de différents virus enveloppés, en particulier le virus de la grippe. Ce facteur serait impliqué dans l'inhibition des premières phases d'entrée du virus dans la cellule hôte et en particulier dans l'inhibition de la fusion des membranes virales avec la membrane des endosomes, limitant la propagation de l'ADN viral dans la cellule infectée (Perreira et al., 2013). Nous avons recruté une étudiante de master 2, Géraldine Mayeux, pour effectuer ce travail que j'ai co-encadré avec le professeur Weissenhorn. Par la suite, Géraldine ayant obtenu une bourse de thèse, j'ai naturellement continué à co-superviser son travail sur la caractérisation biochimique et structurale de ce facteur de restriction. Géraldine s'est attelée à produire, purifier et caractériser cette protéine membranaire. Nous avons également réussi à la reconstituer au sein de membranes artificielles (liposomes, nanodisques) afin de les étudier sous leur forme active. L'analyse structurale d'IFITM3 reconstituée en nanodisques par RMN nous a permis d'identifier une courte région hélicoïdale dans la région N-terminale extramembranaire d'IFITM3 jamais décrite auparavant et pouvant correspondre à un motif d'internalisation. Nous avons en outre observé, par microscopie électronique à coloration négative, de potentiels effets d'IFITM3 sur la courbure de la membrane de liposomes qui pourraient être à l'origine de son action inhibitrice sur la fusion virale. Et enfin, nous avons montré au travers d'expériences TEVC (Voltage-clamp à deux électrodes) que lorsqu'IFITM3 était présente dans l'environnement extracellulaire d'ovocytes de xénope, celle-ci était capable d'engendrer des fuites ioniques au travers de la membrane des ovocytes qui pourraient résulter soit, d'une déstabilisation de la membrane par IFITM3 soit, d'une formation de pores membranaires par la protéine.

Géraldine a soutenu sa thèse en 2018.

I.3.2.2 Projet Viperin

En parallèle des activités de recherche dirigées par le professeur Weissenhorn, j'ai développé un projet de recherche personnel portant sur un facteur de restriction de l'immunité innée, responsable de l'inhibition de la réplication de nombreux virus enveloppés et pathogènes tels que le VIH, le virus de la grippe (influenza), de la dengue, le cytomégalovirus, le virus de l'hépatite C, le virus du Nil et de Sindbis. Cette protéine appelée Viperin (Virus Inhibitory Protein Endoplasmic reticulum-associated Interferon induced) est un produit de la stimulation par l'interféron de type I et inhibe la réplication des virus au cours de l'étape de bourgeonnement. En particulier, les virus VIH et influenza bourgeonnent à partir de radeaux lipidiques qui sont des micro-domaines membranaires enrichis en cholestérol et en sphingolipides et qui permettent aux glycoprotéines virales de s'accumuler pour former la membrane virale (Ono and Freed, 2005). Il a été montré que l'expression de la viperin diminue la formation de ces radeaux lipidiques, associée à une diminution de la libération de virions qui restent enchâssés à la surface de la membrane plasmique formant des chainettes de virus (Wang et al., 2007). Ce phénomène avait été décrit à l'époque comme directement lié à l'interaction de la viperin avec la Farnesyl diPhosphate Synthase (FPPS) et à l'inhibition de son activité enzymatique (Wang et al., 2007). La FPPS est une enzyme clef dans la biosynthèse des lipides de type isoprénoides tel que le cholestérol et son inhibition par la viperin serait directement liée à la diminution de radeaux lipidiques au niveau de la membrane plasmique.

L'importance de la viperin dans la régulation de la biosynthèse des lipides pour contrer ou augmenter la réplication virale, m'a conduite à m'intéresser à cette protéine. Elle a la particularité de contenir un agrégat fer-soufre dans son domaine catalytique SAM radical (S-Adenosylméthionine). Les enzymes de type SAM radical utilisent la réduction d'un électron de l'agrégat $[Fe_4S_4]$ afin de cliver la SAM et produire la méthionine et un radical très réactif le 5'-deoxyadenosyl ($5'dA^*$), lui-même capable d'initier des réactions de chimie radicalaire sur de nombreux substrats.

J'ai obtenu une ANR jeune chercheuse en 2016, dont j'étais la coordinatrice, afin de comprendre les mécanismes selon lesquels l'expression de la viperin interfère avec le processus de biosynthèse des lipides au cours de l'infection des cellules par le virus de la grippe A. Cette ANR m'a permis de financer un postdoc sur 30 mois de janvier 2016 à juin 2018 et une étudiante en master 2 sur 6 mois de janvier à juin 2017. J'ai également encadré

une étudiante de Master 1 et un étudiant de Licence 3 sur ce sujet en 2015 et 2017 respectivement. Nous avons cloné et purifié différentes constructions de viperin humaines ainsi que de différents organismes homologues. La présence d'un cluster fer-soufre dans ces protéines nous a forcé à reconstituer les protéines en milieu anaérobie, procédure qui a été facilitée grâce à notre collaboration avec le groupe métalloprotéines dirigé par Yvain Nicolet à l'IBS. Les protocoles de purification et de reconstitution ont été développés avec succès mais les essais de cristallisation qui ont été menés sont restés sans succès.

Dans un deuxième temps, nous avons essayé d'identifier le substrat de la viperin afin d'expliquer comment les propriétés biochimiques peuvent conduire à son activité antivirale. Nous avons ainsi développé un test fonctionnel afin de tester l'activité de la viperin en présence de SAM (S-Adenosylmethionine), sodium dithionite (un fort agent réducteur et donneur d'électrons) et de différents substrats potentiels. Nous avons suivi l'activité catalytique grâce à la production de 5'-deoxyadenosine (5'dA) en utilisant un instrument couplant HPLC-RF-MS. Nous avons tout d'abord démontré que la protéine FPPS n'avait aucun effet sur l'activité de la viperin humaine comme cela avait été évoqué dans plusieurs publications (Figure 9A). Nous avons ensuite testé différentes molécules, intermédiaires dans la voie métabolique du mévalonate. Cette voie enzymatique est utilisée par les eucaryotes pour produire des métabolites impliqués dans des processus tels que la synthèse de terpénoïdes, de stéroïdes et dans la prénylation des protéines (Goldstein and Brown, 1990). L'enzyme FPPS utilise 2 de ces précurseurs l'isopentenyl pyrophosphate (IPP) et le dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) pour catalyser la formation de geranyl pyrophosphate (GPP) et de farnesyl pyrophosphate (FPP). De façon intéressante, l'ajout de GPP ou de FPP dans la réaction augmente de façon drastique l'activité de la viperin, au contraire des autres métabolites de la même voie métabolique (Figure 9A).

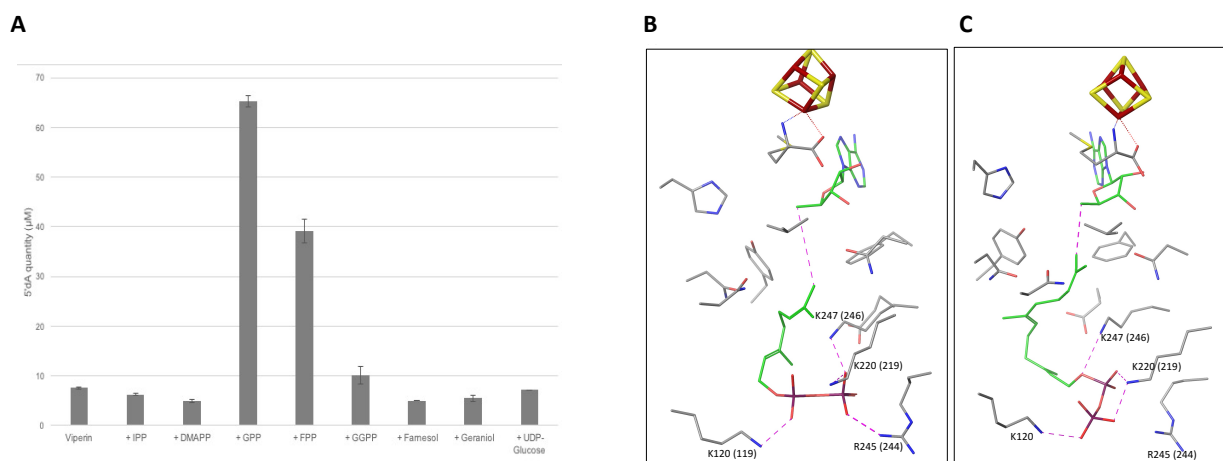


Figure 9 : (A) Figure reproduite de (Mikulecky et al., 2018). Détection de la production de 5'dA par la viperin humaine après ajout de SAM, sodium dithionite et de différents substrats potentiels. La réaction est incubée 120 minutes à 20°C. Parmi les molécules isoprénoïdes testées, le GPP et le FPP augmentent de façon drastique l'activité basale de la viperin humaine d'un facteur 5 et 4 respectivement. (B et C) Docking moléculaire des substrats GPP et FPP (en vert) dans le site actif de la viperin (en gris). Le cluster $[Fe_4S_4]$ est représenté en bâtonnets jaunes et rouges.

Nous avons ensuite vérifié que ces deux métabolites étaient de véritables substrats pour la viperin humaine grâce à une expérience de deutération spécifique du GPP et FPP par notre enzyme. Enfin nous avons réalisé du docking moléculaire sur la structure de la viperin de souris (Fenwick et al., 2017) en présence de GPP et de FPP afin de démontrer que ces deux molécules pouvaient entrer dans la cavité enzymatique de la protéine et que la réaction de clivage de la SAM était possible (Figure 9B et C). Nous avons également réalisé des mutations afin de confirmer nos expériences de docking. Ces différents résultats sont en accord avec l'observation d'une diminution de la formation de radeaux lipidiques au cours de l'infection virale (Wang et al., 2007) puisque la cascade enzymatique de production des isoprénoïdes pourrait être bloquée par la modification d'un des intermédiaires. Nous avons ainsi proposé que le GPP et/ou le FPP pourrait subir une modification par le radical 5'dA[•], inhiber la cascade enzymatique de la voie du mévalonate et ainsi conduire à l'inhibition de la formation de cholestérol et à l'inhibition du bourgeonnement viral. Nous avons tenté d'identifier les modifications sur le GPP et FPP entraînées par l'action du 5'dA[•] mais sans succès. Ces résultats ont été publiés dans FEBS Letters en 2018 (Mikulecky et al., 2018)

Suite à mon congé maternité de juin 2018 à novembre 2018, j'ai décidé d'intégrer le groupe pathogénie bactérienne de l'IBS dirigé par le Dr Andréa Dessen. Ce changement de thématique m'a permis de renouer avec les thématiques de pathogénie et de virulence bactérienne que j'avais abordées pendant ma thèse et mon premier contrat postdoctoral. Dans cette équipe je développe actuellement une nouvelle thématique sur les enzymes NRPS (Non Ribosomal Protein Synthetase) et PKS (Polyketide Synthase) qui sont responsables de la synthèse de molécules chimiques complexes, aux propriétés toxiques, antibiotiques, anti-cancéreuses, etc...

En parallèle, j'ai finalisé des expériences d'un projet initié au laboratoire il y a quelques années sur des macroglobulines bactériennes et leur lien avec la pathogénie de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

I.3.2.3 Projet macroglobulin

Les alpha-2-macroglobulines (A2M) sont des facteurs de l'immunité innée chez les eucaryotes qui sont responsables de l'inhibition des protéases. Ces protéines ont également été découvertes chez les bactéries et en particulier, notre collaboratrice Ina Atrée (IBS, groupe Pathogénèse Bactérienne et Réponses Cellulaires PBRC) a découvert un opéron chez *Pseudomonas aeruginosa* codant pour 6 protéines MagA, B, C, D, E, F dont une A2M, MagD (Robert-Genthon et al., 2013). Les souches de *P. aeruginosa* ne possédant pas MagD ont montré une diminution de leur virulence dans des modèles d'infection chronique (Potvin et al., 2003).

Des travaux précédents effectués dans notre laboratoire ont montré que les protéines de l'opéron interagissaient entre elles et en particulier l'A2M MagD interagissait avec la protéine MagC dont la fonction est inconnue. Afin de comprendre la fonction de MagC, nous avons initié des études structurales et résolu sa structure à 1.74 Å de résolution. La structure de MagC montre un repliement similaire à celui des protéines de la famille des NlpC/P60 souvent impliquées dans le clivage du peptidoglycan. Nous avons ensuite montré que MagC interagissait avec le peptidoglycan spécifique des bactéries Gram négatives mais qu'elle ne le clivait pas. Une mutation en marge du site actif, conservée dans les protéines « MagC-like », provoque une distorsion du site actif ne permettant pas une activité catalytique de clivage du peptidoglycan.

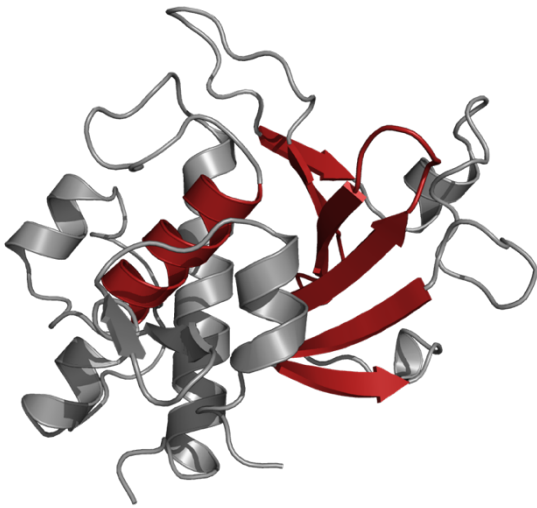


Figure 10 : Structure tridimensionnelle de MagC possédant un repliement de type NlpC/P60, capable d'interagir avec le peptidoglycan.

Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la protéine MagC pourrait être impliquée dans l'ancrage du complexe macroglobuline à la membrane et au peptidoglycan afin d'établir sa fonction de défense contre les protéases de l'hôte.

Ces résultats ont été publiés dans FEBS Letters en 2021 (Zouhir et al., 2021).

I.3.2.4 Projet colibactine

Je m'intéresse actuellement à la production d'une génotoxine chez certaines souches pathogènes d'*Escherichia coli*, la colibactine. J'ai co-encadré, avec Andréa Dessen, une étudiante en Master 2 en 2019, Sarah Bonhomme, qui a continué en thèse dans notre laboratoire et qui a soutenu sa thèse en juillet 2022. J'ai également co-supervisé deux autres étudiantes de Master 2 et deux étudiants de Master 1 sur le sujet. J'ai également obtenu un financement de la ligue régionale contre le cancer en décembre 2019 afin d'initier ce projet dans les meilleures conditions.

Je vais décrire plus amplement ce projet dans la partie Projet de recherche.

II. Projets de recherche

Depuis ma thèse, mes travaux de recherche se sont articulés autour de deux axes qui sont, d'une part les études structure-fonction de protéines d'intérêt médical, qu'elles soient bactériennes ou bien humaines afin d'enrayer des processus infectieux. D'autre part, j'ai développé des compétences sur les interactions hôte-pathogènes d'un point de vue structural par études de complexes. Mon intégration dans le groupe de Pathogénie bactérienne de l'IBS m'a permis de commencer à développer un projet qui relie ces deux axes de recherche, sur les protéines de type NRPS (Non Ribosomal Protein Synthetase) et PKS (Polyketide Synthase) de bactéries pathogènes. Ces enzymes forment généralement des méga-complexes et sont responsables de la production de métabolites secondaires chez la bactérie, importants pour sa défense et le contrôle de son environnement. A ce stade, je présenterai deux projets de recherche impliquant les protéines NRPS et PKS chez des souches d'*E. coli* pathogènes et chez *Pseudomonas aeruginosa*.

II.1 Biosynthèse des peptides non ribosomaux et polycétides par des assemblages multi-domaines

Les peptides non-ribosomaux (NRP), les polycétides (PK) et leurs dérivés sont des métabolites secondaires synthétisés par de nombreux microorganismes au même titre que certains antibiotiques et molécules antifongiques (Homburg et al., 2007). Ces molécules ont généralement un rôle d'adaptation aux conditions environnementales particulières pour les micro-organismes et ont souvent été exploitées en médecine. En particulier, de nombreux antibiotiques font partie de la famille des NRP/PK, tels que la pénicilline G, l'érythromycine, la vancomycine ou bien la bacitracine. L'immunosuppresseur rapamycine et les anti-cancéreux bléomycine et épothilone sont d'autres exemples de molécules NRP/PK d'importance cruciale en médecine. Ces molécules sont synthétisées par des méga complexes multi-protéiques assemblés en opéron comportant deux activités enzymatiques principales, portées d'une part par les NRPS (non-ribosomal peptide synthetases) et d'autre part par les PKS (polyketide synthases).

Chaque protéine PKS ou NRPS est assemblée sous forme modulaire, chaque module étant responsable de l'ajout d'une unité chimique (un acide aminé dans le cas des NRPS et un acyle-coA dans le cas des PKS) à la structure du produit final. Chaque module est lui-même

organisé en différents domaines responsables de l'activation, éventuellement de la modification et du transfert de l'unité d'un module à un autre. Cette voie d'assemblage est généralement très complexe et comporte de nombreuses protéines multi-modulaires assemblées comme une véritable chaîne de montage. Un assemblage classique comprend un premier module d'initiation suivi par des modules d'élongation pour finir par un module de terminaison afin de libérer le produit final.

Un des domaines essentiels au bon fonctionnement de ces chaînes de montage est le domaine carrier protein (peptidyl carrier protein PCP pour les NRPS et acyl carrier protein ACP pour les PKS). Ces domaines sont modifiés post-traductionnellement par une phosphopanthéine transferase afin de rajouter un bras phosphopanthéine (PPant) sur une sérine conservée des domaines ACP/PCP. Les différents substrats sont chargés directement sur la fonction thiol terminale du bras PPant par formation d'une liaison thioester et les domaines ACP/PCP présentent ainsi leurs substrats à tous les autres domaines enzymatiques.

II.2 Les méga-enzymes NRPS

L'organisation classique des systèmes NRPS comprend un domaine d'adénylation (A) qui sélectionne et active un acide aminé par hydrolyse d'une molécule d'ATP et transfère d'un groupement AMP sur le substrat acide. Celui-ci est ensuite transféré sur le bras PPant d'un PCP afin de former un intermédiaire thioester. Cet intermédiaire est enfin transféré au domaine de condensation qui catalyse la formation d'une liaison amide entre le groupement aminoacyle du PCP donneur situé en amont et celui du PCP accepteur situé en aval. Alternativement, un domaine de cyclisation peut venir catalyser la réaction de condensation ainsi qu'une réaction de cyclohydratation afin de former un cycle thiazoline ou oxazoline.

Des domaines optionnels de modification permettent également de diversifier les métabolites NRP avant l'incorporation du substrat par le domaine A, sur le substrat attaché au domaine PCP ou après la libération du NRP. Parmi les domaines caractérisés structurellement, on trouve les domaines cétoréductase (Alonzo et al., 2020), d'épimérisation (Wang et al., 2022), de formylation (Reimer et al., 2016), de méthylation (Mori et al., 2018), oxydase (Fortinez et al., 2022)...

Les études structurales des NRPS se sont, pendant de nombreuses années, focalisées sur des domaines isolés jusqu'à récemment où des modules entiers, voire des di-modules ont été résolus (Bonhomme et al., 2021) (Figure 11). Ces structures ont, jusqu'à récemment, montré un arrangement monomérique et une grande flexibilité (Drake et al., 2016; Kreitler et al., 2019; Reimer et al., 2016, 2019; Tanovic et al., 2008) et ont, pour la plupart, été résolues grâce à des analogues de substrats ou des inhibiteurs (Gulick and Aldrich, 2018). La flexibilité inter-module a été démontré en particulier par les études à haute résolution de la protéine LgrA (Reimer et al., 2019) qui ont dévoilé plusieurs structures de fragments multi-domaines contenant un module d'initiation entier et un ou plusieurs domaines du module d'élongation. Les auteurs ont, en particulier, bloqué le premier module dans une conformation de thiolation (transfert de l'acide aminé sur le bras PPant du PCP) par un inhibiteur et ont observé le deuxième module dans deux conformations différentes dans la même unité asymétrique du cristal, mettant en évidence la flexibilité du linker inter-modulaire (Figure 11 H-J).

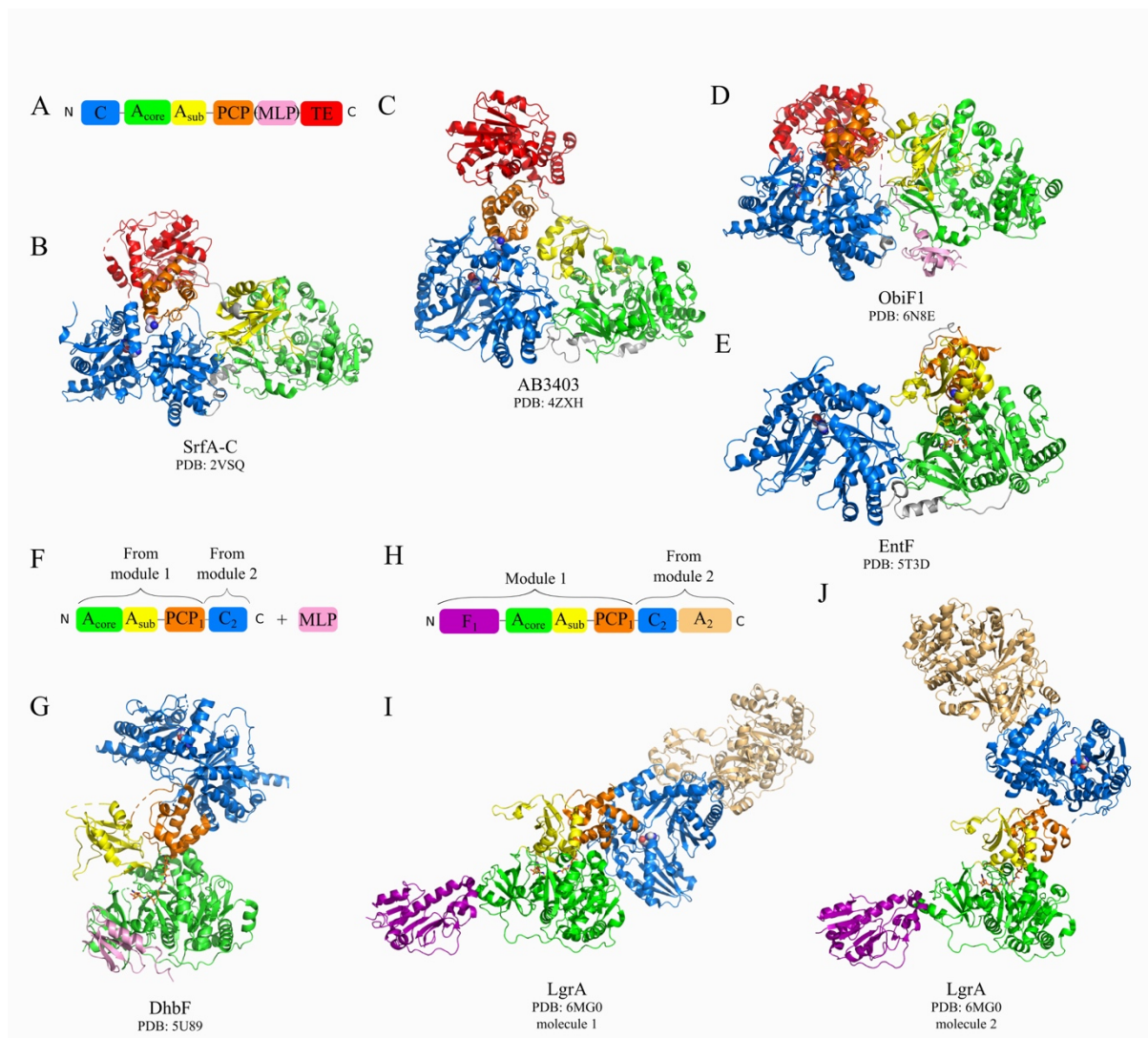


Figure 11 : Structures de modules de NRPS monomériques. (A, B) Organisation des domaines et structure cristallographique du module de terminaison *SrfA-C* (Tanovic et al., 2008), (C) *AB-3403* (Drake et al., 2016), *ObiF1* (Kreitler et al., 2019), (E) *EntF* (Drake et al., 2016). (F-G) Composition en domaines et structure cristallographique de *DhbF* (Tarry et al., 2017). (H-J) Composition en domaines et structures cristallographiques de *LgrA* dans différentes conformations (Reimer et al., 2019).
Figure reproduite de (Bonhomme et al., 2021)

Très récemment, l'affirmation que toutes les NRPS étaient sous forme monomérique a été mise à mal avec trois exemples de NRPS dimériques : *FmoA3*, *PchE* et *BmdB_{M2}-BmdC*. *FmoA3* et *PchE* dimérisent en tête à queue par leur fragment cyclisation-Adénylation (Katsuyama et al., 2021; Wang et al., 2022) alors que pour le module *BmdB*, la dimérisation s'effectue par une enzyme à activité oxydase (*BmdC*) dont le complexe a été co-cristallisé ou stabilisé pour des études en microscopie électronique (Fortinez et al., 2022) (Figure 12).

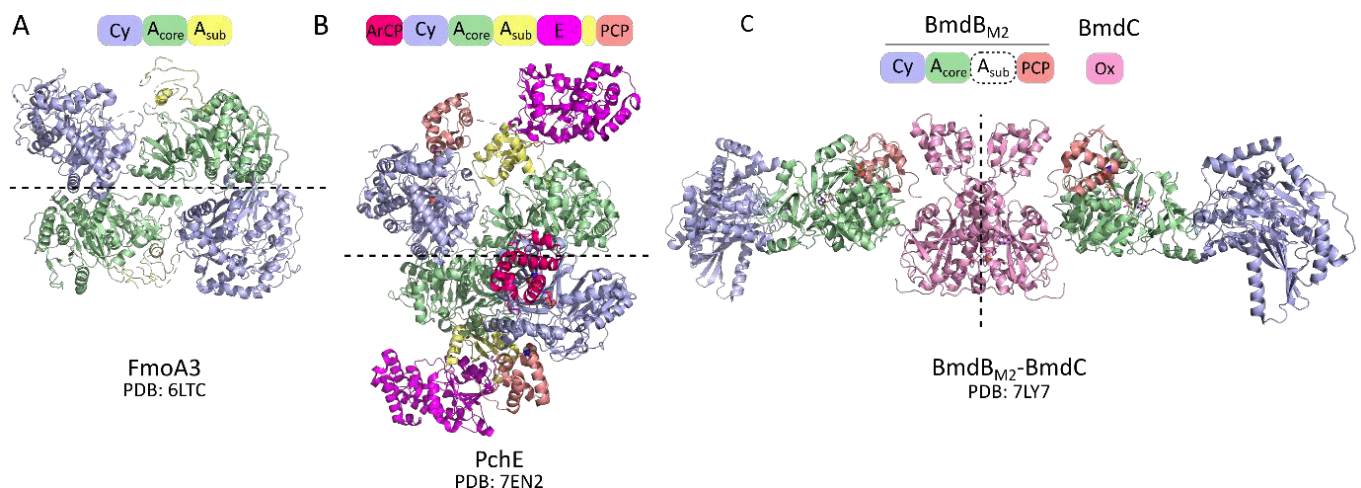


Figure 12. Structures de NRPS dimériques. (A) Composition en domaines et structure de *FmoA3*. (B) Composition en domaines et structure de *PchE*. (C) Composition en domaines et structure de *BmdB_{M2}-BmdC*. Figure issue de la thèse de Sarah Bonhomme (2022).

II.3 Les méga-enzymes PKS

Chez les PKS, on retrouve le même type d'assemblage que chez les NRPS, avec un domaine acyltransferase (AT) qui est responsable de la sélection du substrat donneur, le malonyl Co-A (ou un dérivé), qui sera ensuite transféré sur le bras PPant du domaine ACP. Le domaine ketosynthase (KS) catalyse une trans-thioesterification, c'est-à-dire l'attaque de la liaison thioester du substrat chargé sur l'ACP donneur situé en amont par la fonction thiol d'une cystéine conservée sur le domaine KS. Ensuite, le KS catalyse une réaction de

condensation de type Claisen, c'est-à-dire la formation d'une liaison carbone-carbone par une condensation décarboxylative entre le substrat accepteur attaché à l'ACP situé en aval et la chaîne acyle donneuse pour former un β -ketothioester qui peut ensuite être modifié par des enzymes de type ketoreductase, déhydratase, enoylreductase ou méthyltransferase.

Les enzymes PKS modulaires peuvent être divisées en deux classes distinctes, à savoir les PKS *cis*-AT pour lesquelles le domaine AT est inséré dans chaque module (Dodge et al., 2018) et les PKS *trans*-AT pour lesquelles le domaine AT est codé par une protéine indépendante (Kosol et al., 2018).

Les études structurales des PKS ont également été initiées par des études de domaines isolés ou des di-domaines jusqu'à plus récemment où, des structures de modules entiers de PKS de type *cis*-AT ont été résolues telles que la protéine Lsd14 de *Streptomyces lasalocidi* participant à la biosynthèse de l'antibiotique lasalocide A (Bagde et al., 2021) ou le module 1 de la 6-deoxyerythronolide B synthase (DEBS) responsable de la biosynthèse de l'antibiotique erythromycine de *Saccharopolyspora erythraea* (Cogan et al., 2021) (Figure 13B). Des structures de PKS itératives, c'est-à-dire fonctionnant en boucle pour ajouter le même métabolite au substrat final, ont également été résolues, en particulier celle de la « fatty acid synthase » de mammifère (mFAS) (Maier et al., 2008) (Figure 13A), la protéine LovB responsable de la biosynthèse de la lovastatine chez *Aspergillus terreus* (Wang et al., 2021) ou bien Pks5 une synthase de lipo-oligosaccharides de *Mycobacterium segmentatis* (Herbst et al., 2018). La plupart des structures résolues possèdent une conformation en X avec une région de condensation comprenant les domaines KS-AT sous forme étendue et une région de modification comprenant les domaines de modification (Figure 13A-B). En revanche, une étude en microscopie électronique sur la protéine PikAIII, le cinquième module de la chaîne d'assemblage synthétisant l'antibiotique pikromycine de *Streptomyces venezuelae* (Dutta et al., 2014) a montré un arrangement différent montrant une conformation en arche du di-domaine KS-AT conduisant à la formation d'une chambre catalytique unique et close (Figure 13C), contrairement aux deux chambres ouvertes observées chez les autres PKS itératives ou modulaires (Figure 13A-B).

Le travail structural sur l'enzyme PikAIII a également permis de reconstituer l'ensemble de son cycle catalytique grâce au chargement de l'enzyme avec différents substrats de la réaction (Dutta et al., 2014; Whicher et al., 2014). Malgré le fait que peu de détails soient visibles dans ces structures, ce travail a permis de mettre en évidence des

changements conformationnels importants au cours de la reconnaissance du substrat par le domaine ACP, qui n'auraient pas pu être prévus *in silico*. La nature du substrat chargé sur le domaine ACP apparaît comme crucial pour le positionnement de ce domaine ainsi que pour l'arrangement de l'ensemble du module. Bien que des réserves ont été émises quant à la représentativité du cycle de PikAIII pour les PKS modulaires, ces structures à moyenne résolution ont fourni les premières captures de complexes transitoires entre le domaine ACP et les domaines catalytiques des PKS. Il aura fallu attendre sept ans pour à nouveau visualiser des structures de module PKS contenant le domaine ACP, cette fois-ci à bien plus haute résolution (3-4 Å en microscopie électronique) (Bagde et al., 2021; Cogan et al., 2021) (Figure 13B).

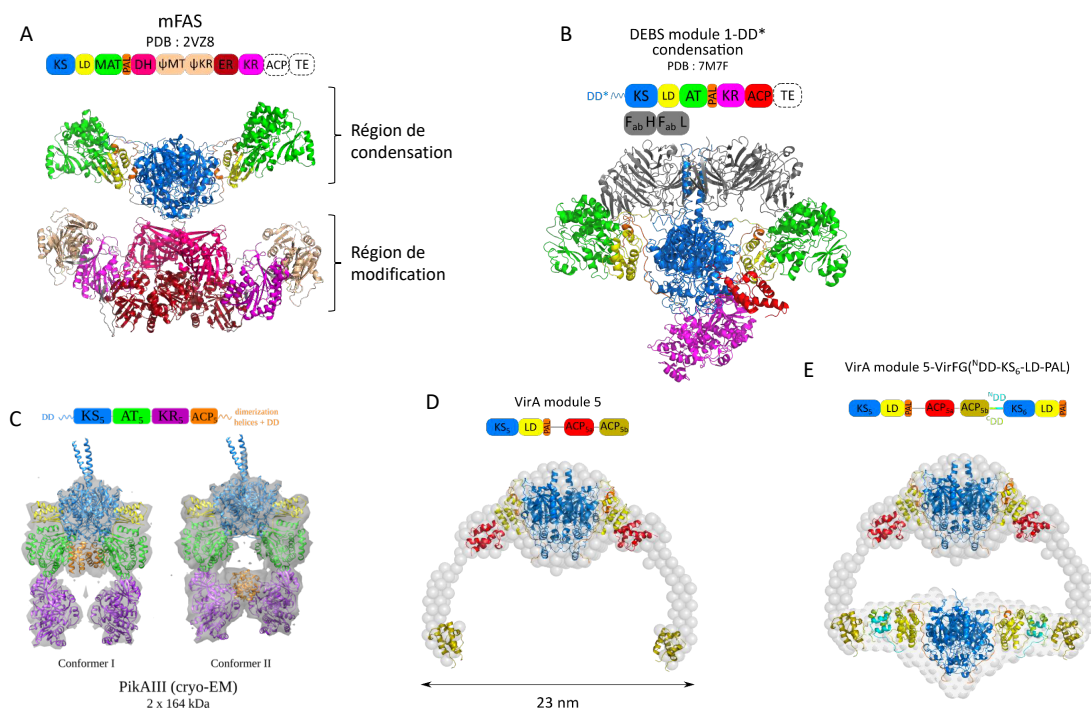


Figure 13 : Organisation des domaines et Structures de PKS itérative ou modulaires. (A) Structure de la PKS itérative fatty acid synthase de mammifère mFAS. (B) Structure du module 1 de DEBS en complexe avec un anticorps Fab. (C) Structures de PikAIII montrant le domaine ACP positionné différemment selon deux conformations différentes. (D) Structure de la PKS trans-AT VirA obtenue par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS). (E) Modèle SAXS du complexe entre le module 5 VirA et le module 6 VirFG de la virginiamycine.

Environ 40% des PKS modulaires chez les bactéries sont de type *trans*-AT (Kosol et al., 2018) et malgré la grande diversité et la large répartition des PKS de type *trans*-AT, ces mégasynthases et les divers produits qu'elles synthétisent sont très peu caractérisés. Le seul modèle

d'un module complet d'une PKS *trans*-AT est celui obtenu par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) du cinquième module de VirA participant à la biosynthèse de l'antibiotique virginiamycine chez *Streptomyces virginiae* (Davison et al., 2014) (Figure 13D-E). Similairement à PikAIII, VirAM5 adopte une conformation archée avec le dimère de KS au sommet de l'arche, mais cette arche est plus ouverte et ne délimite pas une chambre catalytique close (Figure 13D). Plus récemment, un modèle a été proposé pour le di-module VirA (module 5)-VirFG (module 6) par SAXS, en superposant les modèles des protéines obtenues séparément et suggère que l'interaction entre les modules induit la fermeture de l'arche formée par le module 5 (Dorival et al., 2016). Ces données suggèrent que les PKS *trans*-AT, malgré une organisation différente des PKS *cis*-AT, pourraient aussi utiliser des chambres réactionnelles. Malgré tout, les données sur les PKS de type *trans*-AT sont assez limitées, en particulier des données à haute résolution de module complet pourraient nous éclairer sur différents mécanismes catalytiques spécifiques de ces enzymes.

II.4 Les hybrides NRPS/PKS

La similarité de fonctionnement des assemblages NRPS et PKS a conduit à la découverte d'assemblages hybrides au sein du même opéron comportant des modules NRPS et PKS soit au sein de protéines séparés, soit au sein du même polypeptide. Ces systèmes augmentent drastiquement la complexité des molécules synthétisées qui incorporent tour à tour des unités acyles et aminoacyles (Miyanaga et al., 2018). Les interfaces entre les modules hybrides sont qualifiées de séparées si les modules sont sur des polypeptides différents ou bien de fusionnées si les modules se trouvent au sein du même polypeptide (Miyanaga et al., 2018). Les informations structurales sur des assemblages hybrides de type fusionné sont limitées à des structures de domaines isolés (Yun et al., 2020) ou de simple module (Wang et al., 2021), posant ainsi les questions de l'organisation et de l'interaction entre les deux types de synthèses au sein d'une même chaîne polypeptidique. Les changements de conformation intra- et inter-domaines lors de réactions catalytiques ainsi que l'arrangement de ces domaines individuels seraient également d'un grand intérêt. La détermination de l'état oligomérique des protéines hybrides est également un challenge puisque la majorité des études sur les PKS et les NRPS semblent montrer un état oligomérique différent pour ces deux synthèses.

II.5 Projet colibactine

II.5.1 Le rôle de la colibactine au sein du microbiote intestinale

Escherichia coli est une bactérie à la fois commensale colonisant l'intestin de mammifères mais qui peut également être l'agent responsable de nombreuses maladies infectieuses. Cette polyvalence est liée à la capacité que possède la bactérie de produire de nombreux facteurs de virulence responsables de la dérégulation de fonctions cellulaires. Des études ont montré que des souches d'*E. coli* commensales ainsi que des souches pathogènes extra-intestinales, induisaient des dommages irréversibles à l'ADN telles que des cassures de la double hélice *in vitro* (Nougayrède et al., 2006) et *in vivo* dans les entérocytes (Cuevas-Ramos et al., 2010), des pontages au sein du même brin d'ADN (Vizcaino and Crawford, 2015) ou bien des alkylations de la double hélice (Wilson et al., 2019) ; ces dommages pouvant conduire au développement de cancers colorectaux dans des modèles animaux (Dalmaso et al., 2014). Ces différents phénomènes sont reliés à la production d'un métabolite secondaire génotoxique appelé colibactine.

La colibactine est une molécule hétérodimérique contenant deux cycles cyclopropanes responsables de l'alkylation des adénines de l'ADN générant des ponts inter-brins. Elle contient également deux cycles thiazoles qui sont des motifs fréquemment retrouvés comme intercalant de l'ADN (Figure 14B). La biosynthèse de la colibactine dépend de l'îlot génétique *pks* qui code pour un assemblage de plus de 2 mégadaltons comportant 19 protéines, parmi elles 3 NRPS (ClbH, ClbJ, ClbN), 3 PKS (ClbC, ClbI, ClbO) et 2 hybrides NRPS/PKS (ClbB, ClbK) (Figure 14A). L'îlot *pks* est également présent chez d'autres Entrobactéries telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter aerogenes* mais également chez deux symbiotes bactériens, *Frischella perrara* isolée d'une abeille et chez une souche de *Pseudovibrio* isolée d'un corail (Bondarev et al., 2013; Engel et al., 2015).

En plus de son action génotoxique, à l'origine d'un effet pro-carcinogène, plusieurs études suggèrent également l'importance des souches possédant l'îlot *pks* dans l'écologie du microbiote, un environnement complexe composé de nombreuses espèces microbiennes. Une première étude a démontré un effet antibiotique modéré des souches *pks+* d'*E. coli* contre plusieurs souches de *Staphylococcus aureus*, en particulier contre des souches multi-

résistantes aux antibiotiques (Fais et al., 2016). Le mécanisme de l'effet antibiotique n'a pas été déterminé à l'époque mais une étude récente suggère fortement que les dommages à l'ADN générés par la colibactine déclencheraient l'induction du cycle lytique de prophages intégrés dans le génome de *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella enterica* ou *Enterococcus faecium* (Silpe et al., 2022). Une autre étude montre l'effet bactéricide des souches *pks+* contre des souches de *Vibrio cholera*, cet effet dépendant de cassures double-brin dans le génome de *V. cholera*. Enfin l'îlot *pks* confère un effet anti-inflammatoire à certaines souches, notamment la souche d'*E. coli* Nissle 1917 utilisée comme probiotique (Olier et al., 2012) sous le nom de Mutaflor® et dont la sureté est maintenant questionnée aux vues des conséquences génotoxiques précédemment évoquées.

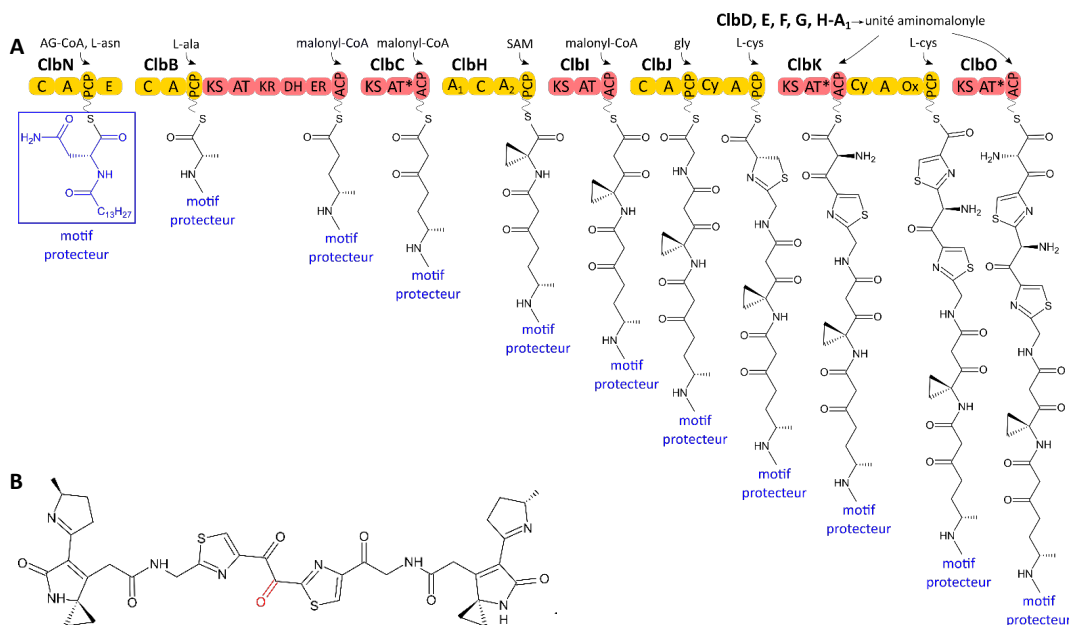


Figure 14 : (A) Premières étapes de la biosynthèse de la colibactine. Les modules NRPS sont en jaunes et les modules PKS en rose. (B) Structure de la colibactine. Figure adaptée de la thèse de Sarah Bonhomme, 2022. Abréviation des domaines : C : condensation, A : Adenylation, PCP : Peptidyl carrier protein, E : Epimerization, KS : Ketosynthase, AT : Acyl transferase, AT* : Acyl transferase tronqué, KR : Ketoreductase, DH : Dehydratase, ER : Enoyl reductase, ACP : Acyl carrier protein, Cy : Cyclisation

II.5.2 Études structurales des protéines Clb

La première partie de la biosynthèse de la colibactine est bien établie (Faïs et al., 2018; Wernke et al., 2020) (Figure 14A). Elle débute par la synthèse du motif protecteur N-myristoyl-D-asparagine par la NRPS ClbN. L'hybride NRPS-PKS ClbB ajoute ensuite une alanine puis une unité malonyle qui est entièrement réduite par les domaines réducteurs de ClbB. Une unité malonyle est ensuite incorporée par la PKS ClbC. ClbH n'utilise pas un acide aminé protéinogène mais incorpore le substrat S-adénosylméthionine, ensuite converti en cycle cyclopropane par la PKS ClbI (Zha et al., 2017), qui rajoute également une unité malonyle. La NRPS ClbJ incorpore deux acides aminés, une glycine et une cystéine. Cette dernière formera le premier cycle thiazole de la colibactine après cyclisation et oxydation. Les deux derniers modules PKS, le premier module de ClbK et ClbO, ne sont pas entièrement fonctionnels. Ces modules ne sélectionnent pas leur substrat directement mais utilisent un substrat aminomalonyl fourni par ClbG (Brachmann et al., 2015). La construction de ce substrat fait intervenir les enzymes ClbD, ClbE, ClbF et ClbH. Le deuxième module de ClbK est responsable de la synthèse du deuxième cycle thiazole.

Comme mentionné plus haut, aucune donnée structurale n'est connue à ce jour en ce qui concerne les hybrides fusionnées de type NRPS/PKS et même l'état oligomérique de ces méga-enzymes est incertain. Je me suis donc focalisée dans un premier temps sur les deux hybrides de l'îlot *pks*, ClbB et ClbK, ce qui pourrait nous permettre d'augmenter les connaissances structurales sur les hybrides NRPS/PKS en général et de mieux comprendre la biosynthèse de la colibactine d'autre part.

II.5.2.1 ClbK

Comme indiqué plus haut, ClbK est une cible de choix pour la caractérisation des interfaces hybrides PKS/NRPS. Sarah Bonhomme qui a intégré notre laboratoire en 2018 pour un stage de M2 et qui a ensuite continué en thèse grâce à un financement de l'École Normale Supérieure, a très grandement contribué à l'avancée des connaissances sur ClbK. Elle a utilisé une stratégie de dissection-reconstruction afin d'obtenir des informations structurales sur différents domaines de ClbK et d'élucider son état oligomérique (Figure 15).

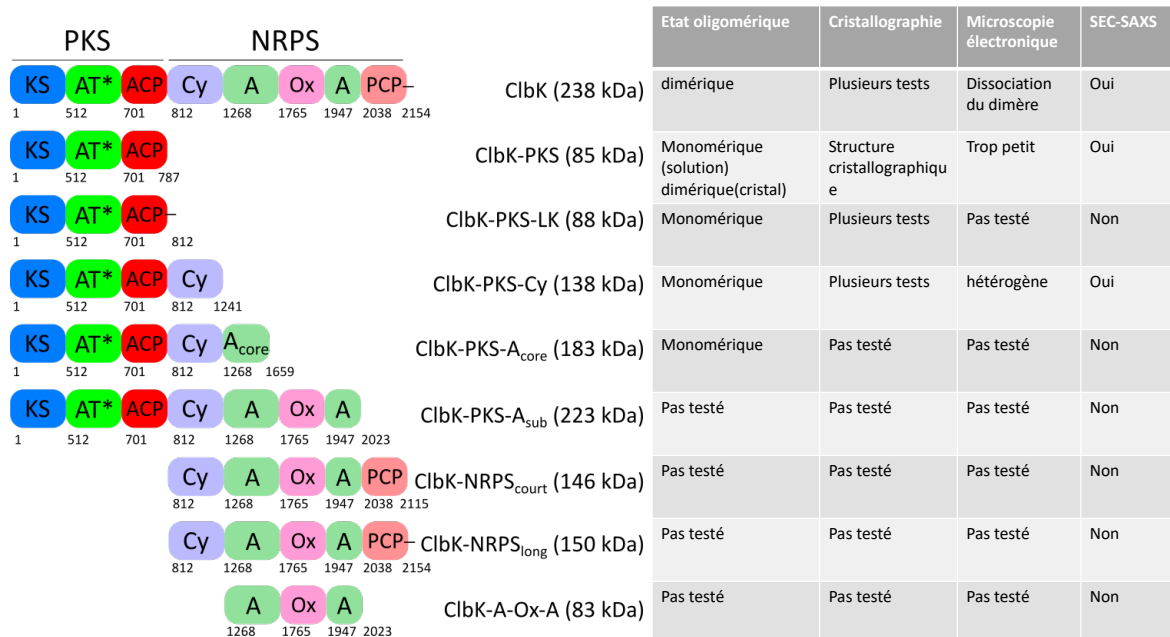


Figure 15 : Fragments de ClbK générés au cours de la thèse de Sarah Bonhomme. Figure adaptée de sa thèse.

ClbK entière

En particulier, Sarah a exprimé et purifié la protéine ClbK entière, qu'elle a montré être dimérique en solution par SEC-MALLS. Nous avons ensuite réalisé des expériences de **microscopie électronique par coloration négative** afin de visualiser cette protéine de près de 480 kDa. Malheureusement, le dimère se dissocie sur les grilles de microscopie et les particules sont trop hétérogènes pour envisager une étude plus poussée en cryo-microscopie électronique (Figure 16A). Afin de palier à cette hétérogénéité, nous avons modifier les conditions de tampon, réalisé des expériences de pontage chimique et de séparation des espèces par gradient de glycérol ou de sucrose, mais sans succès pour le moment.

En revanche, nous collaborons actuellement avec le groupe de Stanislav Gobec de l'université de Ljubljana afin de générer des inhibiteurs permettant de bloquer le module NRPS dans une conformation de thiolation. En effet, certaines structures de NRPS ont été résolues en présence d'analogues non hydrolysables du produit de la réaction, généralement des molécules de type adénosine vinyl-sulfonamides (AVS) qui permettent de capturer l'interaction productive entre les domaines A et PCP au moment du transfert de l'acide aminé sur le groupement thiol du bras PPant du PCP (Gulick and Aldrich, 2018). Ce type de molécules pourrait permettre une meilleure stabilisation du module NRPS.

D'autre part, j'ai initié un projet Instruct (European Research Infrastructure Consortium for Structural biology research) afin de générer des anticorps de camélidés (nanocorps) dirigés spécifiquement contre ClbK. En effet leurs petites tailles et leur capacité à reconnaître spécifiquement une région variable ont fait de ces outils un véritable atout dans les études de biologie structurale et pourraient ainsi stabiliser une conformation particulière de ClbK et/ou stabiliser sa forme dimérique.

Afin d'obtenir des informations structurales sur ClbK nous nous sommes ensuite tournés vers la **diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS)**. La diffusion couplée à un système de séparation des particules par filtration sur gel (SEC-SAXS) nous a permis d'obtenir des courbes de diffusion exploitable afin de calculer des modèles *ab initio* (Figure 16B-C). Le modèle de ClbK entière permet de dégager quelques caractéristiques structurales telle que sa taille approximative (25 nm x 19 nm x 10 nm) qui confirme la présence d'un dimère en solution (Figure 16C). Le modèle possède un cœur compact avec des extrémités allongées rattachées à ce cœur, qui isolent des cavités ressemblant aux chambres catalytiques décrites pour les PKS.

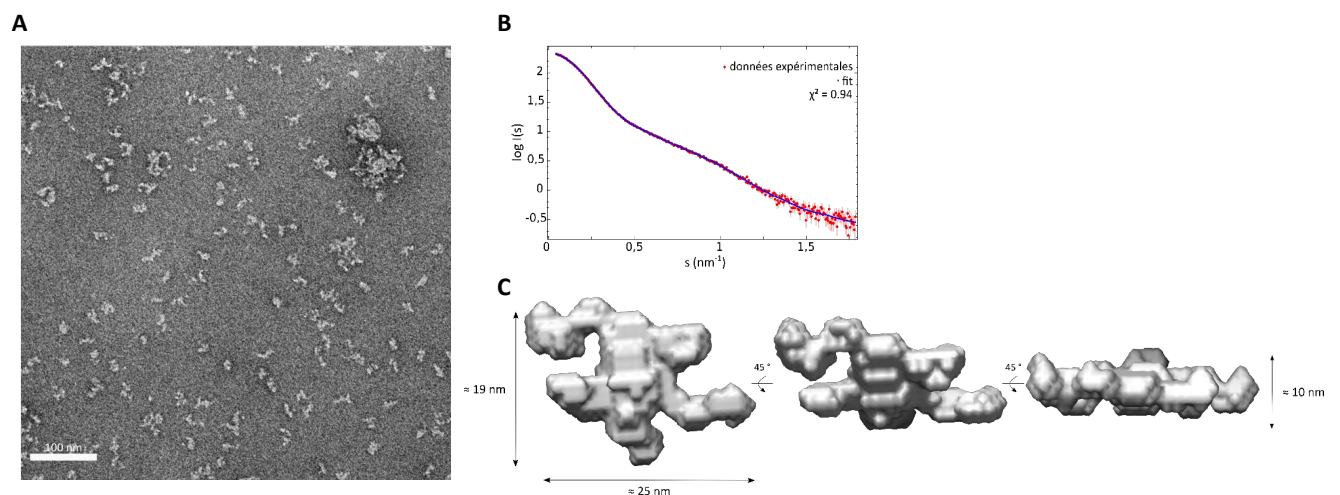


Figure 16 : (A) Image de microscopie électronique par coloration négative. (B) Courbe de diffusion SAXS expérimentale (rouge) superposée avec la courbe de diffusion du modèle (bleue) généré par le programme DAMMIN (C).

ClbK-PKS

Dans un deuxième temps, Sarah s'est concentrée sur la construction appelée ClbK-PKS comprenant le module PKS en N-terminal de ClbK et qui contient les domaines KS, AT* et ACP

(Figure 15). Le domaine AT* de ClbK est un domaine acyltransferase dont les résidus conservés catalytiques sont absents, créant ainsi un domaine AT non fonctionnel. Le module PKS de ClbK est donc considéré soit comme une PKS de type *trans*-AT, soit comme une PKS de type *cis*-AT avec domaine AT dégénéré qui devra être complétée par l'enzyme *trans*-AT ClbG afin de charger le substrat aminomalonyl sur l'ACP (Brachmann et al., 2015).

De façon étonnante, le module PKS est monomérique en solution mais cristallise sous forme dimérique. Nous avons obtenu des cristaux de ClbK-PKS qui ont **diffracté les rayons X** à 3 Å de résolution et nous avons résolu la structure par remplacement moléculaire en utilisant un modèle généré par le logiciel AlphaFold2 (Jumper et al., 2021). Le modèle de ClbK-PKS ainsi obtenu comprend deux dimères de ClbK-PKS dans l'unité asymétrique qui dimérisent par les domaines KS (Figure 17A). De part et d'autre du domaine KS, se trouvent 2 domaines AT* qui sont normalement constitués d'un large sous-domaine, ici partiellement tronqué et d'un petit sous-domaine, ici absent, ce qui explique sa non-fonctionnalité. L'arrangement global du di-domaine KS-AT* possède une conformation étendue similaire à celle obtenue pour les enzymes mFAS et DEBS par exemple (Figure 13A-B), différente de la conformation en arche de PikAIII (Figure 13C). Enfin, un domaine ACP par dimère est visible dans la densité électronique, confirmant sa position variable du fait de sa fonction de transport de substrat vers les différents domaines catalytiques. La position du domaine ACP est atypique et est localisée au niveau de l'entrée interne du domaine KS qui n'a été décrite qu'une fois chez PikAIII (Figure 17B). Il existe également une entrée principale sur le côté du domaine KS et la présence de ces deux entrées pourraient expliquer la discrimination entre les substrats donneur et accepteur au moment de l'étape de condensation. Dans cette hypothèse, le domaine PCP de ClbJ, qui doit délivrer son substrat donneur à la cystéine active de ClbK-KS (Figure 14), utiliserait l'entrée de côté du domaine KS et le domaine ACP de ClbK utiliserait l'entrée interne pour délivrer le substrat accepteur (l'aminomalonyl) au domaine KS.

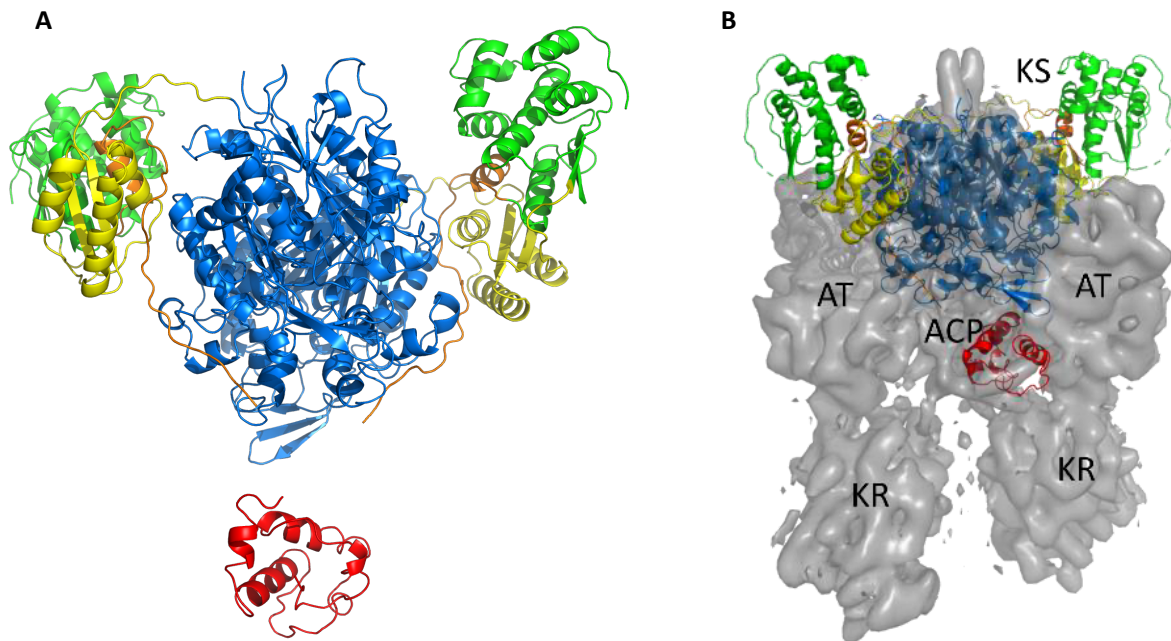


Figure 17 : (A) Structure cristallographique de ClbK-PKS avec le domaine KS en bleu, linker entre le KS et AT* en jaune, AT* en vert, le linker post AT* en orange et l'ACP en rouge. (B)

Modèle de l'architecture de ClbK

Sarah a pu montrer que la protéine ClbK entière était dimérique en solution. En revanche toutes les autres constructions qu'elle a testées sont restées monomériques (Figure 15). La protéine PKS dont nous avons obtenu la structure, cristallise comme un dimère, en accord avec les structures des PKS obtenues dans la littérature. Nous en avons conclu que le module PKS ne permettait que partiellement la dimérisation de ClbK et qu'un domaine en aval du module PKS était responsable d'une autre interface de dimérisation. Par analogie avec la structure de BmdB-BmdC résolue récemment (Fortinez et al., 2022), nous avons suggéré que le domaine oxidase pourrait favoriser la dimérisation du module NRPS et permettre une dimérisation de l'ensemble de la protéine ClbK. Nous avons donc proposé un modèle de l'architecture globale de ClbK basée sur nos résultats structuraux et sur la structure de BmdB-BmdC (Figure 18). Ce modèle représente le premier modèle d'une protéine hybride PKS/NRPS.

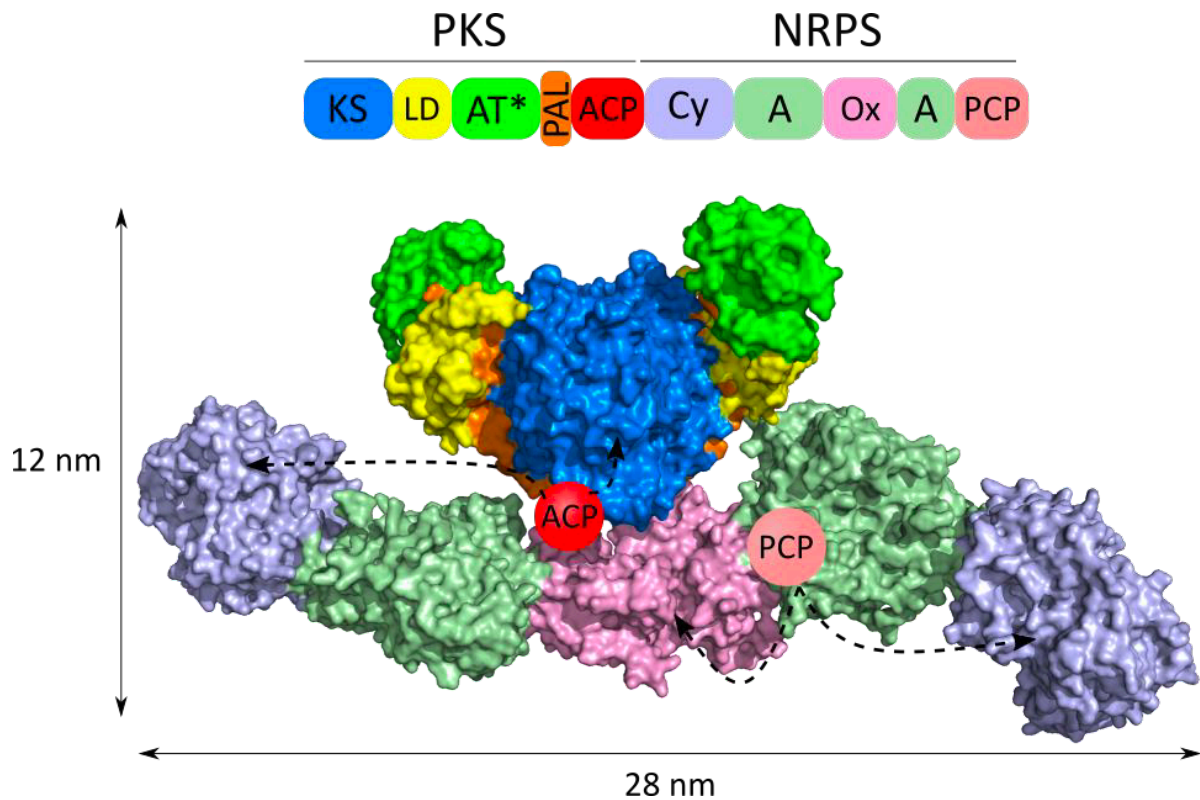


Figure 18 : Modèle de l'architecture de l'hybride PKS-NRPS ClbK.

Perspectives sur la protéine ClbK

Ces premiers résultats structuraux nous permettent d'envisager un mécanisme d'action des protéines hybrides et ouvrent la porte à de nombreuses questions concernant les différentes interactions entre ClbK et les protéines situées en amont ou en aval de la chaîne de montage. En particulier, Le domaine AT* non fonctionnel de ClbK est complété par l'enzyme *trans*-AT ClbG, qui charge le domaine ACP de ClbK avec un substrat aminomalonyl (AM). Bien que plusieurs structures de complexes *trans*-AT-ACP aient été résolues, le mode de reconnaissance du domaine ACP par l'enzyme *trans*-AT dans le contexte du module n'est pas établi. En particulier, ClbG charge-t-elle directement son unité AM sur l'ACP ou bien existe-t'il une plate-forme d'amarrage au niveau du domaine AT* ou des domaines de liaison permettant l'accroche de ClbG ? Afin de répondre à ces questions, une étudiante de M2 de l'ENS de Paris, Maria Davila Miliani a rejoint notre laboratoire en 2022. Elle a exprimé et purifié la protéine ClbG et réalisé les premiers essais de liaisons entre ClbK-PKS et ClbG tant au niveau biochimique que structural. Jusqu'à présent, nous n'avons pas réussi à observer d'interaction entre ClbK et ClbG mais nous avons émis l'hypothèse que la présence du substrat AM est peut-être requise afin de stabiliser cette interaction transitoire.

Des expériences sont actuellement en cours afin de générer ce substrat AM qui sera ensuite utilisé dans des expériences d'interactions et de cristallisation.

D'autre part, il serait intéressant de comprendre le mode d'interaction entre ClbK et les enzymes situées directement en amont et en aval, i.e. ClbJ et ClbO qui forment toutes deux des interfaces hybrides séparées avec ClbK (Figure 14). En effet ClbJ est une enzyme possédant deux modules NRPS et dont le substrat est directement transféré au module PKS de ClbK formant ainsi une interface hybride NRPS-PKS séparée et dont les modalités d'interaction sont inconnues. Une structure du complexe entre ClbK-PKS et le domaine PCP de ClbJ chargé avec le substrat donneur de la condensation permettrait également de confirmer notre hypothèse sur quelle entrée est utilisée par le PCP de ClbJ pour délivrer son substrat au niveau du domaine KS de ClbK.

De la même façon le module NRPS de ClbK délivre son substrat au module PKS de ClbO par une interface hybride NRPS-PKS probablement similaire. L'étude de ces complexes entre polypeptides hybrides serait une importante source d'informations en ce qui concerne la formation de ces méga-complexes et la biosynthèse de molécules hybrides.

II.5.2.2 ClbB

Les informations recueillis sur la protéine hybride ClbK nous ont permis d'envisager une étude similaire sur la deuxième protéine hybride ClbB possédant un module NRPS en N-terminal et un module PKS en C-terminal. ClbB est impliquée au début de la biosynthèse de la colibactine puisqu'elle agit en tant que deuxième effecteur (Figure 14). Elle ajoute une alanine et une unité malonyle qui est entièrement réduite par les domaines réducteurs de ClbB (Figure 14).

Quentin Bertrand, un étudiant en thèse, puis Victor Simon un étudiant de M1 et enfin Marie As, étudiante en M2 ont tour à tour essayer de purifier ClbB entière mais avec beaucoup de difficultés. Marie a tout de même obtenu une quantité raisonnable de ClbB afin de réaliser des études en solution et montrer un équilibre monomères/dimères de cette protéine. Quelques clichés de microscopie électronique ont pu être obtenue mais ont montré une grande hétérogénéité nécessitant d'améliorer l'échantillon avant d'entreprendre des études plus poussées (Figure 19).

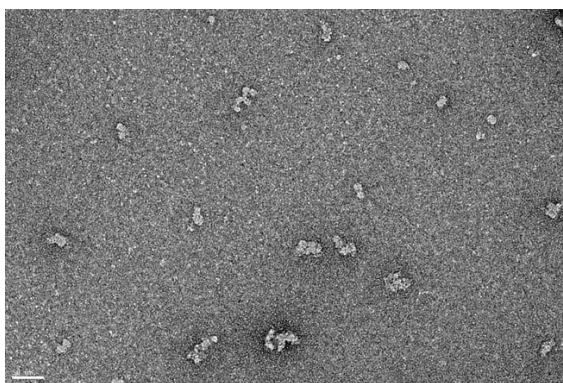


Figure 19 : Cliché de microscopie électronique de la protéine ClbB.

En revanche, les résultats obtenus par dissection de modules de ClbK nous permettent d'envisager une approche similaire sur ClbB afin d'identifier des fragments stables de cette protéine et d'effectuer des tests de cristallogénèse sur ses différents modules.

II.5.2.3 ClbN

La première protéine impliquée dans la biosynthèse de la colibactine est la protéine ClbN qui est responsable de la synthèse d'un motif protecteur N-myristoyl-D-asparagine. Celui-ci participe à la production de pré-colibactine et est ensuite clivé en fin de synthèse, au moment de l'export de la pré-colibactine dans le périplasma de la bactérie. Victor Simon, étudiant de M1 puis Marie As, étudiante de M2 ont initié l'expression et la purification de ClbN afin de comprendre cette première étape de biosynthèse et essayer de générer un complexe entre ClbN et ClbB.

Marie a réussi à obtenir une protéine soluble et stable qui est monomérique en solution mais qui n'a malheureusement pas cristallisé malgré les nombreux efforts consentis en mutant les résidus catalytiques ou bien des résidus de surface afin de réduire l'entropie et favoriser la cristallisation. En revanche, elle a initié une étude en microscopie électronique encourageante qui devra être poursuivie en améliorant l'homogénéité de l'échantillon (Figure 20A). Marie a également obtenu des données de SAXS qui ont permis de générer un modèle *ab initio* de ClbN (Figure 20 B-C) ; de plus amples analyses de ces données sont nécessaires afin d'obtenir un modèle comprenant les domaines de ClbN et intégrer des paramètres de flexibilité inter-domaines grâce aux programmes conventionnels.

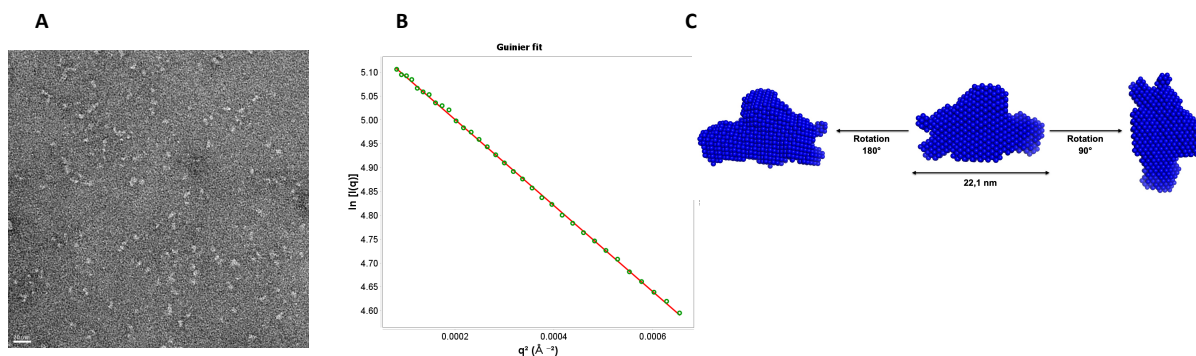


Figure 20 : (A) Cliché de microscopie électronique de ClbN en coloration négative. (B) Présentation des données SAXS par la représentation de Guinier et modèle *ab initio* de ClbN généré par le programme DAMMIN (C).

II.5.2.4 Objectif opéron Clb entier

Le projet colibactine à long terme, pourrait nous permettre d’approfondir nos connaissances, d’une part sur les protéines NRPS/PKS isolées afin de comprendre leurs mécanismes d’action, d’autre part sur les complexes binaires ou tertiaires afin de comprendre les modes d’interaction entre des modules hybrides. Enfin, ce projet est un projet ambitieux à longue échéance puisqu’il existe 19 protéines dans le complexe et qu’à terme, j’aimerais pouvoir le reconstituer dans son ensemble afin de comprendre son mode d’action. Ces protéines pourraient s’assembler en méga-complexe dans le cytoplasme selon des études réalisées sur d’autres complexes NRPS/PKS résolus par microscopie électronique à transmission, dont la taille avoisinerait celle du ribosome (Butcher et al., 2007; Straight et al., 2007). De la même façon, le complexe NRPS/PKS synthétisant la colibactine pourrait s’assembler en méga-complexe à l’intérieur de la cellule, ce qui augmenterait l’efficacité de production et le ciblage de la colibactine synthétisée.

Nous envisageons de purifier le complexe natif grâce à la purification de type **Tandem Affinity purification** (Tap) ou bien par une méthode de pontage chimique *in vivo* grâce à des analogues d’acides aminés photo-réactifs. Ces études seront réalisées dans des souches probiotiques d’*E. coli* que nous pourrions manipuler sans risque au laboratoire. D’autre part, nous sommes en étroite collaboration avec l’équipe du Dr Guy Schoehn à l’IBS pour les études en microscopie électronique en particules uniques. Le criblage des différents échantillons sera effectué par coloration négative sur un microscope électronique T12 et les conditions de cryo

seront testées sur un microscope F20, tous deux disponibles au laboratoire. L'équipe aura également un accès privilégié au nouveau microscope Krios disponible à l'ESRF.

Les questions relatives à l'assemblage des sous-unités individuelles au sein du méga-complexe sont donc des questions fondamentales dans les domaines de la pathogénie bactérienne, de la cancérologie, de la recherche de nouveaux antibactériens et de la biologie de synthèse au sens large puisque ces systèmes NRPS/PKS peuvent être étudiés dans le but d'élaborer des inhibiteurs de nouvelle génération.

II.6 Projet NRPS *Pseudomonas*

Très récemment nous avons initié un nouveau projet en collaboration avec le groupe d'Ina Atrée (IBS, groupe PBRC) sur un nouvel opéron *glo* découvert chez une souche très virulente de *Pseudomonas aeruginosa* causant des pneumonies hémorragiques très agressives, opéron qui contient une protéine NRPS de fonction inconnue. Cette souche pathogène ne possède pas les protéines impliquées dans le système de sécrétion de type III (SST3) classiquement retrouvées chez *P. aeruginosa* mais exprime une nouvelle toxine, l'exolysin, capable de former des pores (Elsen et al., 2014). La présence d'un opéron constitué de 14 protéines, dont une NRPS GloD (Figure 21), dans des souches SST3 négatives indique qu'il pourrait être responsables de la biosynthèse de nouveaux produits naturels qui pourraient agir en partenariat avec la toxine exolysin afin de faciliter l'infection de la bactérie ou bien agir en compétition avec des communautés polymicrobiennes.

Nos deux équipes ont récemment obtenu un financement de l'IDEX (Initiative d'Excellence) afin de financer un étudiant en thèse, Kevin Duarte, qui a commencé sa thèse le 1^{er} janvier 2020 sous mon co-encadrement. Sa thèse s'articule autour d'une combinaison de bio-informatique, de génétique, d'études biochimiques et de biologie structurale afin d'établir le lien entre la biosynthèse des produits issus de cet opéron et la virulence de *P. aeruginosa*. L'exploration de ce lien constituera une toute nouvelle approche dans l'étude des NRPS puisque jusqu'à présent, la plupart des études sur ce type d'enzymes se sont concentrées sur des aspects réactionnels et biochimiques.

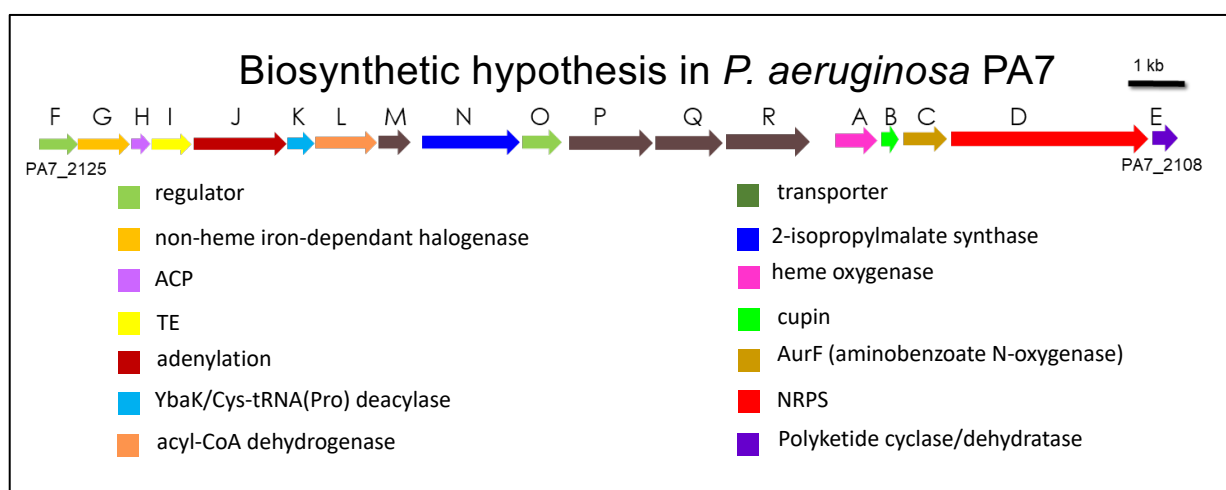


Figure 21 : Représentation de l'opéron *glo* dans la souche *P. aeruginosa* PA7.

Les résultats obtenus sur le projet colibactine ont bénéficié à ce projet en termes de partage de protocoles de purification et d'identification des substrats utilisés par la NRPS de *P. aeruginosa* puisque Kévin a initié des études structurales tant en solution qu'en cristallogénèse sur la protéine NRPS GloD. La collaboration initiée sur le projet colibactine avec le chimiste Stanislav Gobec a également permis de produire un inhibiteur de type AVS sur le substrat valine spécifique de GloD et les tests de cristallisation en présence de substrat sont actuellement en cours. D'autre part, Kévin a obtenu des cristaux d'une autre protéine de l'opéron, GloB dont la fonction cupine avait été prédite bio-informatiquement (Figure 22).

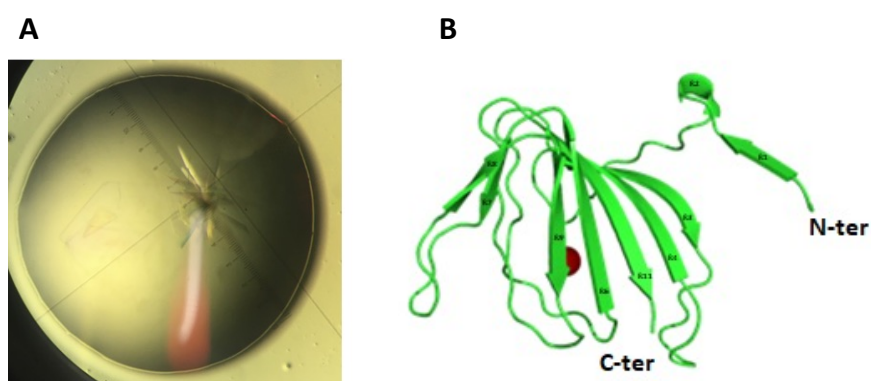


Figure 22 : (A) Cristaux de GloB et (B) Structure de la protéine GloB résolue au laboratoire. Un atome de magnésium est représenté en rouge.

En parallèle, Kévin travaille dans le laboratoire d'Ina Atrée, directement sur les souches pathogènes de *P. aeruginosa* afin de comprendre le rôle des protéines Glo dans la biosynthèse du métabolite associé. Il utilise des techniques de RT-q PCR et de séquençage aléatoire du transcriptome entier (RNA seq) afin de comprendre la régulation de l'opéron. Nous travaillons également en collaboration avec le groupe de Yanyan Li au muséum national d'histoire naturelle de Paris dans le laboratoire de communication et adaptation des micro-organismes afin d'identifier chimiquement le métabolite bio-synthétisé ainsi que le rôle de la NRPS GloD et de la cupine GloB dans la structure de ce métabolite. L'utilité de ce métabolite encore non-identifié n'étant pas connu chez *P. aeruginosa*, ce projet ouvre de nombreuses perspectives tant au niveau de la biologie structurale que d'études structure-fonction afin de mieux appréhender la virulence de cette bactérie pathogène et comprendre son interaction avec l'hôte et au sein du microbiote.

Curriculum Vitae

Pauline Macheboeuf, Chargée de Recherche CNRS de classe normale (CRCN)

Institut de Biologie Structurale (IBS-UMR 5075) CEA/CNRS/UGA – Groupe Pathogénie bactérienne

71 avenue des Martyrs – CS10090

38000 Grenoble, France

FORMATION

- 2006** **Doctorat ès Sciences, spécialité Chimie & Biochimie** de l'Université Grenoble Alpes.
- 2003** **Diplôme d'Études Approfondies** de Biologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université Grenoble Alpes – **Mention Bien.**
- 2002** **Maîtrise de Biochimie** de l'Université Grenoble Alpes en programme d'échange avec l'Université de Californie Santa Barbara (USA) – **Mention Bien.**
- 2001** Licence de Biochimie de l'Université Grenoble Alpes – Mention Assez Bien.
- 2000** DEUG Sciences de la Vie de l'Université Grenoble Alpes.

ACTIVITÉS DE RECHERCHE

- 01/11/2018-** **Chargée de Recherche Classe Normale (CRCN) au CNRS** affectée à l'UMR 5075 : Institut de Biologie Structurale (IBS) dans le laboratoire de **Pathogénie Bactérienne** dirigé par le Dr Andréa Dessen
- 01/10/2015** **Chargée de Recherche de 1^{ère} classe (CR1) au CNRS** affectée à l'UMR 5075 : Institut de Biologie Structurale (IBS) dans le laboratoire de **bourgeonnement des virus enveloppés** dirigé par le Pr. Winfried Weissenhorn.
- 01/11/2018**
- 01/01/2015** **Chargée de Recherche de 2^{ème} classe (CR2) au CNRS** affectée à l'UMR 5075 : Institut de Biologie Structurale (IBS) dans le laboratoire de **bourgeonnement des virus enveloppés** dirigé par le Pr. Winfried Weissenhorn.
- 01/10/2015**
- 01/10/2011-** **Chargée de Recherche de 2^{ème} classe (CR2) au CNRS** affectée à l'UMI 3265 : Interactions entre virus et cellules hôtes (UVHCI) dans le laboratoire du Pr. Winfried Weissenhorn.
- 01/01/2015**
- 02/2010-** **Stage Postdoctoral** l'UVHCI de Grenoble dans le laboratoire du Pr. Winfried Weissenhorn sur l'étude structurale de l'interaction entre la protéine matrice du VIH et le complexe promouvant l'anaphase (APC/C).
- 10/2011**
- 02/2007-** **Stage Postdoctoral** à l'université de Californie à San Diego (USA) dans le laboratoire du Pr. Partho Ghosh sur l'étude de l'interaction entre la protéine de virulence M1 de *Streptococcus pyogenes* et le fibrinogène humain par cristallographie des rayons X.
- 11/2009**
- 11/2003-** **Thèse de doctorat** de l'université Grenoble Alpes, sous la direction des Dr. Otto Dideberg et Andréa Dessen sur l'étude biochimique et structurale de PBP1b de *Streptococcus pneumoniae* et son implication dans la découverte de nouveaux antibiotiques.
- 12/2006**

FINANCEMENTS OBTENUS

- **Financement de la ligue régionale contre le cancer** obtenu en **mars 2020** en tant que **porteur de projet** : 25,000 euros pour 18 mois – Caractérisation structurale du méga-

complexe responsable de la biosynthèse de la colibactin et son lien avec le développement du cancer colorectal.

- **ANR JCJC** obtenue en **Septembre 2015** en tant que **porteur de projet** : 257,000 euros pour 54 mois – Bases structurales des modifications de la synthèse lipidique induites par la viperin au cours de l'infection virale.
- **Financement Finovi** obtenu en **2015** en tant que **partenaire principale** : 50,000 euros pour 24 mois – Étude structurale de cristaux natifs de la protéine NS1 du virus Influenza par cristallographie sérielle et laser à électrons libres.
- **Financement ANR 2011** en tant que **partenaire** sur 3 ans – Études structurales des protéines ESCRT humaines impliquées dans le bourgeonnement des virus enveloppés.
- **Financement ANR 2011** en tant que **partenaire** sur 3 ans – Études structurales des protéines ESCRT d'archaebactéries.
- **Bourse postdoctorale** de la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) d'une durée de 2 ans obtenue en **décembre 2009**.

ENCADREMENTS D'ÉTUDIANTS M2 ET THÈSE

- 6 étudiantes de M2 en **codirection** :

- **Maria-Cecilia Davila Miliani** – Stage de M2 encadré en 2022 (ENS Paris)

- **Marie As** – Stage de M2 encadré en 2021 (UGA)

- **Sarah Bonhomme** – Stage de M2 encadré en 2018 (ENS Lyon) – **Publication P18 et P20**

- **Elena Andreeva** - Stage de M2 encadré en 2017 (UGA) - **Publication P14**

- **Géraldine Mayeux** – Stage de M2 encadré en 2013 (UGA)

- **Emilie Poudevigne** – Stage de M2 encadré en 2009 (UGA) – **Publication P10**

- 5 **co-encadrements de thèse de l'UGA** :

- **Kévin Duarte** – Thèse co-encadrée avec Andréa Dessen et Ina Attrée depuis janvier 2020 – Soutenance prévue en mai 2023.

- **Sarah Bonhomme** – Thèse co-encadrée avec Andréa Dessen depuis septembre 2019 – **Publication P18 et P20** – Soutenance le 12 juillet 2022.

- **Nolwenn Miguet** – Thèse co-encadrée avec Winfried Weissenhorn depuis 2016 - **Publication P15** – Soutenance prévue en décembre 2022.

- **Géraldine Mayeux** – Thèse co-encadrée avec Winfried Weissenhorn de 2014 à 2018 – Soutenance en février 2018.

- **Emilie Poudevigne** – Thèse co-encadrée avec Winfried Weissenhorn de 2010 à 2013 – **Publication P10** – Soutenance en septembre 2013.

ENSEIGNEMENT

2013-2015 **Cours magistral en cristallographie des protéines et Séances de travaux dirigés** de L3 de l'Université Grenoble Alpes dans l'UE « Biochimie Structurale ».

2011-2015 **Cours Magistral et Séances de travaux dirigés** dans le cadre du Master 2 « Biochimie et Biologie Structurale » de l'Université Grenoble Alpes.

- 2011-2014** Séances de travaux dirigés dans le cadre du cours EMBO « Structural Characterization of Macromolecular Complexes ».
- 2006** Séances de travaux pratiques de biochimie en première année de DEUG biologie à l'Université Grenoble Alpes.

EXPERTISE SCIENTIFIQUE

Évaluation de manuscrits dans les journaux à comité de lecture pour Molecular Microbiology, Plos One et Nature Communications

RESPONSABILITÉS ADMINISTRATIVES

- 2019-** Membre élue du conseil d'unité de l'IBS
- 2012** Responsable de l'organisation du conseil d'unité de l'UVHCI

PRÉSENTATION ORALES

Présentation orales invitées

O4. « Entry and budding of enveloped viruses. »

Séminaire invité au CEITEC MU à Brno, République tchèque le 8 décembre **2017**.

O3. « Activation and clotting of fibrinogen by Strep M1 protein and its implication in Streptococcal Toxic Shock Syndrome. »

Séminaire invité de l'« Australian National University » à Canberra le 4 mai **2012**.

O2. « Activation and clotting of fibrinogen by Strep M1 protein and its implication in Streptococcal Toxic Shock Syndrome. »

Séminaire invité de l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble le 12 mars 2009 & Séminaire invité de l'EMBL de Grenoble, le 13 mars **2009**.

O1. « Active site restructuring regulates ligand recognition in class A PBPs »

Journée du PSB (Partnership for Structural Biology), 14 Janvier **2005**, Institut Laue Langevin, Grenoble.

Présentations orales sélectionnées

S2. « Bases structurales de la formation d'agrégats entraînant le syndrome du choc toxique streptococcique ».

Séminaire du groupe thématique Biologie de l'Association Française de Cristallographie (AFC) le 6 avril **2012**, Montpellier.

S1. « Activation des PBP de classe A par ouverture du site catalytique : Structure d'un intermédiaire réactionnel »

Association Française de Cristallographie (AFC) Juillet **2006**, Toulouse.

PUBLICATIONS

Articles à comité de lecture

* : Auteur correspondant

- P20.** Bonhomme, S., Dessen, A., **Macheboeuf, P.*** Architecture of a PKS-NRPS hybrid megaenzyme involved in the biosynthesis of the genotoxin colibactin. **Manuscript en revision.**

- P19.** Zouhir, S., Contreras-Martel, C., Robert-Genthon, M., Maragno Trindade, D., Attrée, I., Dessen, A., **Macheboeuf, P.*** (2021) 'MagC is a NlpC/P60-like member of the α -2-macroglobulin Mag complex of *Pseudomonas aeruginosa* that interacts with peptidoglycan'. **FEBS Letters**, **595**, 2034.
- P18.** Bonhomme, S., Dessen, A., **Macheboeuf, P.*** (2021) "The inherent flexibility of type I non-ribosomal peptide synthetase multienzymes drives their catalytic activity. **Open Biology**, **11**, 200386.
- P17.** Woodhouse, J., Nass Kovacs, G., Coquelle, N., Uriarte, L.M., Adam, V., Barends, T.R.M., Byrdin, M., de la Mora, E., Doak, R.B., Feliks, M., Filed, M., Fieschi, F., Guillon, V., Jakobs, S., Joti, Y., **Macheboeuf, P.**, Motomura, K., Nass, K., Owada, S., Roome, C.M., Ruckebusch, C., Schiro, G., Shoeman, R.L., Thepaut, M., Togashi, T., Tono, K., Yabashi, M., Cammarata, M., Foucar, L., Bourgeois, D., Sliwa, M., Colletier, J-P., Schlichting, I., Weik, M. (2020). 'Photoswitching mechanism of a fluorescent protein revealed by time-resolved crystallography and transient absorption spectroscopy'. **Nature Communications**, **11**, 741.
- P16.** De Oliveira Silva, Y.R., Contreras-Martel, C., **Macheboeuf, P.**, Dessen, A. (2020). 'Bacterial secretins : mechanisms of assembly and membrane targeting'. **Protein Science**, doi: 10.1002/pro.3835.
- P15.** Ventimiglia, L.N., Cuesta-Geijo, M.A., Martinelli, N., Caballe, A., **Macheboeuf, P.**, Miguet, N., Parnham, I.M., Olmos, Y., Carlton, J.G., Weissenhorn, W., Martin-Serrano, J. (2018). 'CC2D1B coordinates ESCRT-III activity during the mitotic reformation of the nuclear envelope'. **Developmental Cell**, **47**, 547-563.
- P14.** Mikulecky, P., Andreeva, E., Amara, P., Weissenhorn, W., Nicolet, Y., **Macheboeuf, P.***. (2018). 'Human viperin catalyzes the modification of GPP and FPP potentially affecting cholesterol synthesis'. **FEBS Letters**, **592**, 199-208.
- P13.** Caillat, C., **Macheboeuf, P.**, Wu, Y., McCarthy, A.A., Boeri-Erba, E., Effantin, G., Göttlinger, H.G., Weissenhorn, W., Renesto, P. (2015). 'Asymmetric ring structure of Vps4 required for ESCRT-III disassembly'. **Nature Communications**, **6**, 8781.
- P12.** Lutje Hulshof, D, Liu, Y.Y, Strokappe, N.M., Battella, S., El Khattabi, M., McCoy, L.E., Sabin, C., Hinz, A., Hock, M., **Macheboeuf, P.**, Bonvin, A.M., Langedijk, J.P., Davis, D., Forsman Quigley, A., Aasa-Chapman, M.M., Seaman, M.S., Ramos, A., Poignard, P., Favier, A., Simorre, J.P., Weiss, R.A., Verrips, C.T., weissenhorn, W., Rutten, L. (2013). 'A gp41 MPER-specific llama VHH requires a hydrophobic CDR3 for neutralization but not for antigen recognition'. **PLoS Pathogens**, **9**, Epub 2013 March 7.
- P11.** **Macheboeuf, P.**, Ghosh, P. (2011) 'Structural basis for Streptococcal toxic shock syndrome'. **Médecine sciences**, **27**, 814-6

- P10.** Solomons, J., Sabin, C., Usami, Y., Poudevignes, E., Lutje Hulsik, D., Macheboeuf, P., Hartlieb, B., Göttlinger, H., Weissenhorn, W. (2011) 'Structural basis for ESCRT-III CHMP3 recruitment of AMSH'. *Structure*, **19**, 1149-59.
- P9.** Macheboeuf, P., Buffalo, C., Fu, C-Y., Zinkernagel, A.S., Cole, J.N., Johnson, J.E., Nizet, V., Ghosh, P. (2011) 'Streptococcal M1 protein constructs a pathological host fibrinogen network' *Nature*, **472**, 64-68.
- P8.** Macheboeuf*, P., Piuze, M., Finet, S., Bontems, F., Pérez, J., Dessen, A., Vachette*, P. (2011) 'Solution X-ray scattering study of a full-length class A Penicillin Binding Protein' *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **405**, 107-111.
- P7.** Peel, S, Macheboeuf, P, Martinelli N., Weissenhorn W. (2011) 'Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission' *Trends in Biochemical Sciences*, **36**, 199-210.
- P6.** Lelimosin M., Noirclerc-Savoie M., Lazareno-Saez C., Paetzold B., Le Vot S., Chazal R., Macheboeuf P., Field M.J., Bourgeois D., Royant A. (2009) 'Intrinsic Dynamics in ECFP and Cerulean Control Fluorescence Quantum Yield' *Biochemistry* **48**, 10038-10046.
- P5.** McNamara C., Zinkernagel A.S., Macheboeuf P., Cunningham M. W., Nizet V., Ghosh P. (2008) 'Coiled-coil irregularities and instabilities in group A *Streptococcus* M1 are required for virulence functions.' *Science* **319**, 1405-1408.
- P4.** Macheboeuf P., Lemaire D., Dos Santos Martins A., Dideberg O., Jamin M., Dessen A. (2007) 'Trapping of an acyl-enzyme intermediate in a Penicillin-Binding Protein (PBP)-catalyzed reaction' *Journal of Molecular Biology* **376**, 405-413.
- P3.** Macheboeuf P., Fischer D.S., Brown T.J., Zervosen A., Luxen A., Joris B., Dessen A., Schofield C.J. (2007) 'Structural and Mechanistic Basis of Penicillin-Binding Protein Inhibition by Lactvicins' *Nature Chemical Biology* **3**, 565-569
- P2.** Macheboeuf P., Contreras-Martel C., Job V., Dideberg O., Dessen A. (2006) 'Penicillin Binding Proteins: Key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes' *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 673-691.
- P1.** Macheboeuf P., Di Guilmi A.M., Job V., Vernet T., Dideberg O., Dessen A. (2005) 'Active site restructuring regulates ligand recognition in class A penicillin-binding proteins' *Proceedings of the National Academy of Science of the U S A* **102**, 577-582.

Participation à ouvrages

- N2.** Zapun, A., Macheboeuf P., and Vernet, T. (2017) Penicillin-Binding Proteins and beta-lactam resistance. In Antimicrobial Drug Resistance. Mayers, D. L., Sobel, J. D., Ouellette, M., Kaye, K. S., Marchaim, D. (eds.) Springer, 177-212.

N1. Zapun A., Macheboeuf P., and Vernet T. (2009) 'Penicillin-Binding Proteins and beta-lactam resistance. In Antimicrobial Drug Resistance' Mayers, D. L. (ed.), Humana Press, Totowa (New Jersey), 145-170.

Références

Alonzo, D.A., Chiche-Lapierre, C., Tarry, M.J., Wang, J., and Schmeing, T.M. (2020). Structural basis of keto acid utilization in nonribosomal depsipeptide synthesis. *Nat Chem Biol* *16*, 493–496. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0481-5>.

Bagde, S.R., Mathews, I.I., Fromme, J.C., and Kim, C.-Y. (2021). Modular polyketide synthase contains two reaction chambers that operate asynchronously. *Science* *374*, 723–729. <https://doi.org/10.1126/science.abi8532>.

Bondarev, V., Richter, M., Romano, S., Piel, J., Schwedt, A., and Schulz-Vogt, H.N. (2013). The genus *Pseudovibrio* contains metabolically versatile bacteria adapted for symbiosis. *Environ Microbiol* *15*, 2095–2113. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12123>.

Bonhomme, S., Dessen, A., and Macheboeuf, P. The inherent flexibility of type I non-ribosomal peptide synthetase multienzymes drives their catalytic activities. *Open Biol* *11*, 200386. <https://doi.org/10.1098/rsob.200386>.

Brachmann, A.O., Garcie, C., Wu, V., Martin, P., Ueoka, R., Oswald, E., and Piel, J. (2015). Colibactin biosynthesis and biological activity depend on the rare aminomalonyl polyketide precursor. *Chem Commun (Camb)* *51*, 13138–13141. <https://doi.org/10.1039/c5cc02718g>.

Butcher, R.A., Schroeder, F.C., Fischbach, M.A., Straight, P.D., Kolter, R., Walsh, C.T., and Clardy, J. (2007). The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *PNAS* *104*, 1506–1509. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610503104>.

Caillat, C., Macheboeuf, P., Wu, Y., McCarthy, A.A., Boeri-Erba, E., Effantin, G., Göttlinger, H.G., Weissenhorn, W., and Renesto, P. (2015). Asymmetric ring structure of Vps4 required for ESCRT-III disassembly. *Nat Commun* *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms9781>.

Carlton, J.G., Agromayor, M., and Martin-Serrano, J. (2008). Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 10541–10546. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802008105>.

Chang, C.-H., Lai, L.-C., Cheng, H.-C., Chen, K.-R., Syue, Y.-Z., Lu, H.-C., Lin, W.-Y., Chen, S.-H., Huang, H.-S., Shiau, A.-L., et al. (2011). TBK1-associated Protein in Endolysosomes (TAPE) Is an Innate Immune Regulator Modulating the TLR3 and TLR4 Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* *286*, 7043–7051. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.164632>.

Cogan, D.P., Zhang, K., Li, X., Li, S., Pintilie, G.D., Roh, S.-H., Craik, C.S., Chiu, W., and Khosla, C. (2021). Mapping the catalytic conformations of an assembly-line polyketide synthase module. *Science* *374*, 729–734. <https://doi.org/10.1126/science.abi8358>.

Cuevas-Ramos, G., Petit, C.R., Marcq, I., Boury, M., Oswald, E., and Nougayrède, J.-P. (2010). *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 11537–11542. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001261107>.

- Dalmaso, G., Cougnoux, A., Delmas, J., Darfeuille-Michaud, A., and Bonnet, R. (2014). The bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumor growth by modifying the tumor microenvironment. *Gut Microbes* 5, 675–680. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969989>.
- Davison, J., Dorival, J., Rabeharindranto, H., Mazon, H., Chagot, B., Gruez, A., and Weissman, K.J. (2014). Insights into the function of trans-acyl transferase polyketide synthases from the SAXS structure of a complete module. *Chem. Sci.* 5, 3081–3095. <https://doi.org/10.1039/C3SC53511H>.
- Di Guilmi, A.M., Dessen, A., Dideberg, O., and Vernet, T. (2003). Functional characterization of penicillin-binding protein 1b from *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol* 185, 1650–1658. .
- Dodge, G.J., Maloney, F.P., and Smith, J.L. (2018). Protein-protein interactions in “cis-AT” polyketide synthases. *Nat Prod Rep* 35, 1082–1096. <https://doi.org/10.1039/c8np00058a>.
- Dorival, J., Annaval, T., Risser, F., Collin, S., Roblin, P., Jacob, C., Gruez, A., Chagot, B., and Weissman, K.J. (2016). Characterization of Intersubunit Communication in the Virginiamycin trans-Acyl Transferase Polyketide Synthase. *J Am Chem Soc* 138, 4155–4167. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b13372>.
- Drake, E.J., Miller, B.R., Shi, C., Tarrasch, J.T., Sundlov, J.A., Allen, C.L., Skiniotis, G., Aldrich, C.C., and Gulick, A.M. (2016). Structures of Two Distinct Conformations of holo-Nonribosomal Peptide Synthetases. *Nature* 529, 235–238. <https://doi.org/10.1038/nature16163>.
- Du Plessis, M., Smith, A.M., and Klugman, K.P. (2000). Analysis of penicillin-binding protein 1b and 2a genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 6, 127–131. <https://doi.org/10.1089/107662900419438>.
- Dutta, S., Whicher, J.R., Hansen, D.A., Hale, W.A., Chemler, J.A., Congdon, G.R., Narayan, A.R., Håkansson, K., Sherman, D.H., Smith, J.L., et al. (2014). Structure of a modular polyketide synthase. *Nature* 510, 512–517. <https://doi.org/10.1038/nature13423>.
- Elsen, S., Huber, P., Bouillot, S., Couté, Y., Fournier, P., Dubois, Y., Timsit, J.-F., Maurin, M., and Attrée, I. (2014). A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host Microbe* 15, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.003>.
- Engel, P., Vizcaino, M.I., and Crawford, J.M. (2015). Gut Symbionts from Distinct Hosts Exhibit Genotoxic Activity via Divergent Colibactin Biosynthesis Pathways. *Appl Environ Microbiol* 81, 1502–1512. <https://doi.org/10.1128/AEM.03283-14>.
- Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J.D., Briggs, J.A.G., Weissenhorn, W., and Kozlov, M.M. (2009). Computational model of membrane fission catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput Biol* 5, e1000575. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000575>.

Fais, T., Cougnoux, A., Dalmasso, G., Laurent, F., Delmas, J., and Bonnet, R. (2016). Antibiotic Activity of *Escherichia coli* against Multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *60*, 6986–6988. <https://doi.org/10.1128/AAC.00130-16>.

Fais, T., Delmas, J., Barnich, N., Bonnet, R., and Dalmasso, G. (2018). Colibactin: More Than a New Bacterial Toxin. *Toxins (Basel)* *10*. <https://doi.org/10.3390/toxins10040151>.

Fenwick, M.K., Li, Y., Cresswell, P., Modis, Y., and Ealick, S.E. (2017). Structural studies of viperin, an antiviral radical SAM enzyme. *PNAS* *114*, 6806–6811. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705402114>.

Fortinez, C.M., Bloudoff, K., Harrigan, C., Sharon, I., Strauss, M., and Schmeing, T.M. (2022). Structures and function of a tailoring oxidase in complex with a nonribosomal peptide synthetase module. *Nat Commun* *13*, 548. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28221-y>.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* *343*, 425–430. <https://doi.org/10.1038/343425a0>.

Gulick, A.M., and Aldrich, C.C. (2018). Trapping interactions between catalytic domains and carrier proteins of modular biosynthetic enzymes with chemical probes. *Nat Prod Rep* *35*, 1156–1184. <https://doi.org/10.1039/c8np00044a>.

Hanson, P.I., Roth, R., Lin, Y., and Heuser, J.E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol* *180*, 389–402. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707031>.

Herbst, D.A., Huitt-Roehl, C.R., Jakob, R.P., Kravetz, J.M., Storm, P.A., Alley, J.R., Townsend, C.A., and Maier, T. (2018). The structural organization of substrate loading in iterative polyketide synthases. *Nature Chemical Biology* *1*. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0026-3>.

Homburg, S., Oswald, E., Hacker, J., and Dobrindt, U. (2007). Expression analysis of the colibactin gene cluster coding for a novel polyketide in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* *275*, 255–262. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00889.x>.

Horii, M., Shibata, H., Kobayashi, R., Katoh, K., Yorikawa, C., Yasuda, J., and Maki, M. (2006). CHMP7, a novel ESCRT-III-related protein, associates with CHMP4b and functions in the endosomal sorting pathway. *Biochem J* *400*, 23–32. <https://doi.org/10.1042/BJ20060897>.

Howard, T.L., Stauffer, D.R., Degin, C.R., and Hollenberg, S.M. (2001). CHMP1 functions as a member of a newly defined family of vesicle trafficking proteins. *J Cell Sci* *114*, 2395–2404. <https://doi.org/10.1242/jcs.114.13.2395>.

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* *596*, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.

Katsuyama, Y., Sone, K., Harada, A., Kawai, S., Urano, N., Adachi, N., Moriya, T., Kawasaki, M., Shin-Ya, K., Senda, T., et al. (2021). Structural and Functional Analyses of the Tridomain-Nonribosomal Peptide Synthetase FmoA3 for 4-Methyloxazoline Ring Formation. *Angew Chem Int Ed Engl* 60, 14554–14562. <https://doi.org/10.1002/anie.202102760>.

Kosol, S., Jenner, M., Lewandowski, J.R., and Challis, G.L. (2018). Protein-protein interactions in trans-AT polyketide synthases. *Nat Prod Rep* 35, 1097–1109. <https://doi.org/10.1039/c8np00066b>.

Kreitler, D.F., Gemmell, E.M., Schaffer, J.E., Wencewicz, T.A., and Gulick, A.M. (2019). The structural basis of N-acyl- α -amino- β -lactone formation catalyzed by a nonribosomal peptide synthetase. *Nat Commun* 10, 3432. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11383-7>.

Lata, S., Roessle, M., Solomons, J., Jamin, M., Gottlinger, H.G., Svergun, D.I., and Weissenhorn, W. (2008a). Structural basis for autoinhibition of ESCRT-III CHMP3. *J Mol Biol* 378, 818–827. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.03.030>.

Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Gottlinger, H.G., and Weissenhorn, W. (2008b). Helical structures of ESCRT-III are disassembled by VPS4. *Science* 321, 1354–1357. <https://doi.org/10.1126/science.1161070>.

Lata, S., Schoehn, G., Solomons, J., Pires, R., Göttlinger, H.G., and Weissenhorn, W. (2009). Structure and function of ESCRT-III. *Biochem Soc Trans* 37, 156–160. <https://doi.org/10.1042/BST0370156>.

Lovering, A.L., de Castro, L.H., Lim, D., and Strynadka, N.C.J. (2007). Structural insight into the transglycosylation step of bacterial cell-wall biosynthesis. *Science* 315, 1402–1405. <https://doi.org/10.1126/science.1136611>.

Macheboeuf, P., and Ghosh, P. (2011). Bases structurales du syndrome du choc toxique streptococcique. *Médecine/Sciences* 27, 814–816. <https://doi.org/10.1051/medsci/20112710007>.

Macheboeuf, P., Di Guilmi, A.M., Job, V., Vernet, T., Dideberg, O., and Dessen, A. (2005). Active site restructuring regulates ligand recognition in class A penicillin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 577–582. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407186102>.

Macheboeuf, P., Fischer, D.S., Brown, T., Zervosen, A., Luxen, A., Joris, B., Dessen, A., and Schofield, C.J. (2007). Structural and mechanistic basis of penicillin-binding protein inhibition by lactivicins. *Nat. Chem. Biol* 3, 565–569. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.21>.

Macheboeuf, P., Lemaire, D., Martins, A.D.S., Dideberg, O., Jamin, M., and Dessen, A. (2008). Trapping of an Acyl–Enzyme Intermediate in a Penicillin-binding Protein (PBP)-catalyzed Reaction. *Journal of Molecular Biology* 376, 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.066>.

Macheboeuf, P., Piuizzi, M., Finet, S., Bontems, F., Pérez, J., Dessen, A., and Vachette, P. (2011a). Solution X-ray scattering study of a full-length class A penicillin-binding protein.

Biochemical and Biophysical Research Communications 405, 107–111.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.01.003>.

Macheboeuf, P., Buffalo, C., Fu, C., Zinkernagel, A.S., Cole, J.N., Johnson, J.E., Nizet, V., and Ghosh, P. (2011b). Streptococcal M1 protein constructs a pathological host fibrinogen network. *Nature* 472, 64–68. <https://doi.org/10.1038/nature09967>.

Maier, T., Leibundgut, M., and Ban, N. (2008). The crystal structure of a mammalian fatty acid synthase. *Science* 321, 1315–1322. <https://doi.org/10.1126/science.1161269>.

Martinelli, N., Hartlieb, B., Usami, Y., Sabin, C., Dordor, A., Miguet, N., Avilov, S.V., Ribeiro Jr, E.A., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2012). CC2D1A Is a Regulator of ESCRT-III CHMP4B. *Journal of Molecular Biology* 419, 75–88.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.02.044>.

Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D., Bieniasz, P.D., and Yaravoy, A. (2003). Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12414–12419.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2133846100>.

McNamara, C., Zinkernagel, A.S., Macheboeuf, P., Cunningham, M.W., Nizet, V., and Ghosh, P. (2008). Coiled-coil irregularities and instabilities in group A Streptococcus M1 are required for virulence. *Science* 319, 1405–1408. <https://doi.org/10.1126/science.1154470>.

Mikulecky, P., Andreeva, E., Amara, P., Weissenhorn, W., Nicolet, Y., and Macheboeuf, P. (2018). Human viperin catalyzes the modification of GPP and FPP potentially affecting cholesterol synthesis. *FEBS Letters* 592, 199–208. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12941>.

Miyanaga, A., Kudo, F., and Eguchi, T. (2018). Protein–protein interactions in polyketide synthase–nonribosomal peptide synthetase hybrid assembly lines. *Nat. Prod. Rep.* 35, 1185–1209. <https://doi.org/10.1039/C8NP00022K>.

Mori, S., Pang, A.H., Lundy, T.A., Garzan, A., Tsodikov, O.V., and Garneau-Tsodikova, S. (2018). Structural basis for backbone N-methylation by an interrupted adenylation domain. *Nat Chem Biol* 14, 428–430. <https://doi.org/10.1038/s41589-018-0014-7>.

Muzioł, T., Pineda-Molina, E., Ravelli, R.B., Zamborlini, A., Usami, Y., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2006). Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev Cell* 10, 821–830. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.03.013>.

Nougayrède, J.-P., Homburg, S., Taieb, F., Boury, M., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Buchrieser, C., Hacker, J., Dobrindt, U., and Oswald, E. (2006). *Escherichia coli* Induces DNA Double-Strand Breaks in Eukaryotic Cells. *Science* 313, 848–851.
<https://doi.org/10.1126/science.1127059>.

Olier, M., Marcq, I., Salvador-Cartier, C., Secher, T., Dobrindt, U., Boury, M., Bacquié, V., Penary, M., Gaultier, E., Nougayrède, J.-P., et al. (2012). Genotoxicity of *Escherichia coli*

- Nissle 1917 strain cannot be dissociated from its probiotic activity. *Gut Microbes* 3, 501–509. <https://doi.org/10.4161/gmic.21737>.
- Ono, A., and Freed, E.O. (2005). Role of Lipid Rafts in Virus Replication. In *Advances in Virus Research*, (Academic Press), pp. 311–358.
- Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N., and Weissenhorn, W. (2011). Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends in Biochemical Sciences* 36, 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.09.004>.
- Perreira, J.M., Chin, C.R., Feeley, E.M., and Brass, A.L. (2013). IFITMs Restrict the Replication of Multiple Pathogenic Viruses. *Journal of Molecular Biology* 425, 4937–4955. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.024>.
- Pires, R., Hartlieb, B., Signor, L., Schoehn, G., Lata, S., Roessle, M., Moriscot, C., Popov, S., Hinz, A., Jamin, M., et al. (2009). A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments. *Structure* 17, 843–856. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.04.007>.
- Potvin, E., Lehoux, D.E., Kukavica-Ibrulj, I., Richard, K.L., Sanschagrin, F., Lau, G.W., and Levesque, R.C. (2003). In vivo functional genomics of *Pseudomonas aeruginosa* for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets. *Environmental Microbiology* 5, 1294–1308. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00542.x>.
- Reimer, J.M., Aloise, M.N., Harrison, P.M., and Martin Schmeing, T. (2016). Synthetic cycle of the initiation module of a formylating nonribosomal peptide synthetase. *Nature* 529, 239–242. <https://doi.org/10.1038/nature16503>.
- Reimer, J.M., Eivaskhani, M., Harb, I., Guarné, A., Weigt, M., and Schmeing, T.M. (2019). Structures of a dimodular nonribosomal peptide synthetase reveal conformational flexibility. *Science* 366. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4388>.
- Robert-Genthon, M., Casabona, M.G., Neves, D., Couté, Y., Cicéron, F., Elsen, S., Dessen, A., and Attrée, I. (2013). Unique Features of a *Pseudomonas aeruginosa* α 2-Macroglobulin Homolog. *MBio* 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00309-13>.
- von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Müller, B., Ward, D.M., Chung, H.-Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.-P., Cimbora, D.M., et al. (2003). The protein network of HIV budding. *Cell* 114, 701–713. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00714-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00714-1).
- Silpe, J.E., Wong, J.W.H., Owen, S.V., Baym, M., and Balskus, E.P. (2022). The bacterial toxin colibactin triggers prophage induction. *Nature* 603, 315–320. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04444-3>.
- Solomons, J., Sabin, C., Poudevigne, E., Usami, Y., Hulsik, D.L., Macheboeuf, P., Hartlieb, B., Göttlinger, H., and Weissenhorn, W. (2011). Structural Basis for ESCRT-III CHMP3 Recruitment of AMSH. *Structure* 19, 1149–1159. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.05.011>.

- Straight, P.D., Fischbach, M.A., Walsh, C.T., Rudner, D.Z., and Kolter, R. (2007). A singular enzymatic megacomplex from *Bacillus subtilis*. *PNAS* *104*, 305–310. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609073103>.
- Tanovic, A., Samel, S.A., Essen, L.-O., and Marahiel, M.A. (2008). Crystal Structure of the Termination Module of a Nonribosomal Peptide Synthetase. *Science* *321*, 659–663. <https://doi.org/10.1126/science.1159850>.
- Tarry, M.J., Haque, A.S., Bui, K.H., and Schmeing, T.M. (2017). X-Ray Crystallography and Electron Microscopy of Cross- and Multi-Module Nonribosomal Peptide Synthetase Proteins Reveal a Flexible Architecture. *Structure* *25*, 783-793.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.03.014>.
- Teis, D., Saksena, S., and Emr, S.D. (2008). Ordered Assembly of the ESCRT-III Complex on Endosomes Is Required to Sequester Cargo during MVB Formation. *Developmental Cell* *15*, 578–589. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.08.013>.
- Ventimiglia, L.N., Cuesta-Geijo, M.A., Martinelli, N., Caballe, A., Macheboeuf, P., Miguet, N., Parnham, I.M., Olmos, Y., Carlton, J.G., Weissenhorn, W., et al. (2018). CC2D1B Coordinates ESCRT-III Activity during the Mitotic Reformation of the Nuclear Envelope. *Dev Cell* *47*, 547-563.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.11.012>.
- Vizcaino, M.I., and Crawford, J.M. (2015). The colibactin warhead crosslinks DNA. *Nat Chem* *7*, 411–417. <https://doi.org/10.1038/nchem.2221>.
- Wang, J., Liang, J., Chen, L., Zhang, W., Kong, L., Peng, C., Su, C., Tang, Y., Deng, Z., and Wang, Z. (2021). Structural basis for the biosynthesis of lovastatin. *Nat Commun* *12*, 867. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21174-8>.
- Wang, J., Li, D., Chen, L., Cao, W., Kong, L., Zhang, W., Croll, T., Deng, Z., Liang, J., and Wang, Z. (2022). Catalytic trajectory of a dimeric nonribosomal peptide synthetase subunit with an inserted epimerase domain. *Nat Commun* *13*, 592. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28284-x>.
- Wang, X., Hinson, E.R., and Cresswell, P. (2007). The Interferon-Inducible Protein Viperin Inhibits Influenza Virus Release by Perturbing Lipid Rafts. *Cell Host & Microbe* *2*, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.009>.
- Wernke, K.M., Xue, M., Tirla, A., Kim, C.S., Crawford, J.M., and Herzon, S.B. (2020). Structure and bioactivity of colibactin. *Bioorg Med Chem Lett* *30*, 127280. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127280>.
- Whicher, J.R., Dutta, S., Hansen, D.A., Hale, W.A., Chemler, J.A., Dosey, A.M., Narayan, A.R., Håkansson, K., Sherman, D.H., Smith, J.L., et al. (2014). Structural rearrangements of a polyketide synthase module during its catalytic cycle. *Nature* *510*, 560–564. <https://doi.org/10.1038/nature13409>.

Wilson, M.R., Jiang, Y., Villalta, P.W., Stornetta, A., Boudreau, P.D., Carrá, A., Brennan, C.A., Chun, E., Ngo, L., Samson, L.D., et al. (2019). The human gut bacterial genotoxin colibactin alkylates DNA. *Science* 363, eaar7785. <https://doi.org/10.1126/science.aar7785>.

Yuan, Y., Barrett, D., Zhang, Y., Kahne, D., Sliz, P., and Walker, S. (2007). Crystal structure of a peptidoglycan glycosyltransferase suggests a model for processive glycan chain synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104, 5348–5353. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701160104>.

Yun, C.-S., Nishimoto, K., Motoyama, T., Shimizu, T., Hino, T., Dohmae, N., Nagano, S., and Osada, H. (2020). Unique features of the ketosynthase domain in a nonribosomal peptide synthetase-polyketide synthase hybrid enzyme, tenuazonic acid synthetase 1. *J Biol Chem* 295, 11602–11612. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.013105>.

Zha, L., Jiang, Y., Henke, M.T., Wilson, M.R., Wang, J.X., Kelleher, N.L., and Balskus, E.P. (2017). Colibactin assembly line enzymes use S-adenosylmethionine to build a cyclopropane ring. *Nat Chem Biol* 13, 1063–1065. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2448>.

Zhao, M., Li, X.-D., and Chen, Z. (2010). CC2D1A, a DM14 and C2 Domain Protein, Activates NF- κ B through the Canonical Pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 24372–24380. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.100057>.

Zouhir, S., Contreras-Martel, C., Maragno Trindade, D., Attrée, I., Dessen, A., and Macheboeuf, P. (2021). MagC is a NplC/P60-like member of the α -2-macroglobulin Mag complex of *Pseudomonas aeruginosa* that interacts with peptidoglycan. *FEBS Lett* 595, 2034–2046. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14148>.