

Étudier la membrane des mycobactéries via une approche chimobiologique

Chaque année, 1,8 million de personnes décèdent de la tuberculose, maladie infectieuse causée par *Mycobacterium tuberculosis*. Ces bactéries, communément appelées mycobactéries, possèdent une membrane externe complexe et atypique, nommée mycomembrane (MM) extrêmement résistante et peu perméable aux antibiotiques. La mycomembrane est composée d'acides gras uniques de très longue taille (jusqu'à 90 atomes de carbone) appelés acides mycoliques (AM), ramifiés en α par une chaîne grasse et hydroxylés en β , avec une relation *anti* entre ces deux groupements (figure 1A). Les AM sont estérifiés sur un disaccharide spécifique des mycobactéries, appelé tréhalose, formant le tréhalose monomycolate (TMM). Ce TMM est à la fois un constituant de la MM et un donneur d'AM sur différents composants structuraux de la mycomembrane. Ainsi des enzymes, appelées mycoloyltransférases, permettent le transfert d'un AM d'un TMM sur un autre TMM, formant le tréhalose dimycolate (TDM), ou sur l'arabinogalactane (AG). La biosynthèse des AM est cruciale pour la survie des mycobactéries et certaines enzymes impliquées dans cette biosynthèse sont la cible de médicaments antituberculeux. La biogenèse de la mycomembrane est donc étudiée de près car elle pourrait permettre de mieux comprendre l'exceptionnelle résistance de celle-ci, et à terme de caractériser de nouvelles solutions thérapeutiques.

Les chimistes apportent depuis quelques années des outils puissants pour visualiser des biomolécules spécifiques dans leur contexte cellulaire, notamment en utilisant le marquage métabolique associé à la stratégie du rapporteur chimique. Cette stratégie a émergé il y a une vingtaine d'années sous l'impulsion de Carolyn Bertozzi [1]. Elle consiste à fournir à des cellules en culture un analogue chimique d'une biomolécule pour permettre la visualisation de constituants cellulaires *in vivo* après avoir été pris en charge par des voies métaboliques. Cet analogue comporte une fonction chimique bioorthogonale. Ce type de fonction peut réagir sélectivement et rapidement avec un agent extérieur, par exemple un fluorophore, comportant une fonction chimique complémentaire dans un contexte biologique sans interférer avec les processus biologiques natifs. L'une des réactions bioorthogonales communément utilisée et connue comme

réaction de « chimie click » est la réaction de cycloaddition de Huisgen entre un azoture et un alcyne (« copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC), qui en présence de cuivre(I) permet la formation d'un triazole, et ainsi de lier spécifiquement deux partenaires dans la cellule (figure 2).

Sonde chimique pour l'étude de la mycomembrane

De nombreuses sondes à base de sucres et de glycoconjugués ont été synthétisées pour l'étude de diverses bactéries [2]. Afin de compléter l'arsenal des sondes existantes, nous avons donc entrepris de synthétiser la sonde chimique **1** mimant le TMM et comportant la structure complexe des AM, et présentant un alcyne comme groupe bioorthogonal (figure 1B). Après incorporation métabolique de celle-ci dans la mycomembrane, grâce aux mycoloyltransférases, puis réaction de chimie click avec un fluorophore, il serait possible de visualiser la mycomembrane marquée et d'obtenir ainsi des informations sur la biogenèse de la mycomembrane.

Synthèse de la sonde bioorthogonale

Nous avons envisagé que la relation *anti* de la partie « acide mycolique » de la sonde **1** pourrait être obtenue en deux étapes clés : une réduction sélective de la fonction cétone d'un β -cétoester comportant un alcyne terminal, puis une alkylation diastéréocontrôlée (figure 1B). Afin d'éviter la réduction concomitante de l'alcyne terminal du β -cétoester lors de la première étape, celui-ci a été protégé par un groupement triisopropylsilyyle (TIPS). Ainsi la réduction énantiosélective de Noyori, en présence d'un catalyseur chiral du ruthénium [3], du β -cétoester **2** a conduit au β -hydroxyester **3**. La chaîne grasse en α a ensuite été introduite *via* une réaction d'alkylation diastéréosélective en présence de 1-iododécane, qui préfigure la chaîne α . Lors de cette étape, l'approche du 1-iododécane est favorisée sur la face la moins encombrée de la molécule. Après différents aménagements fonctionnels (déprotections, saponification et estérification), la sonde **1** a pu être isolée (figure 3).

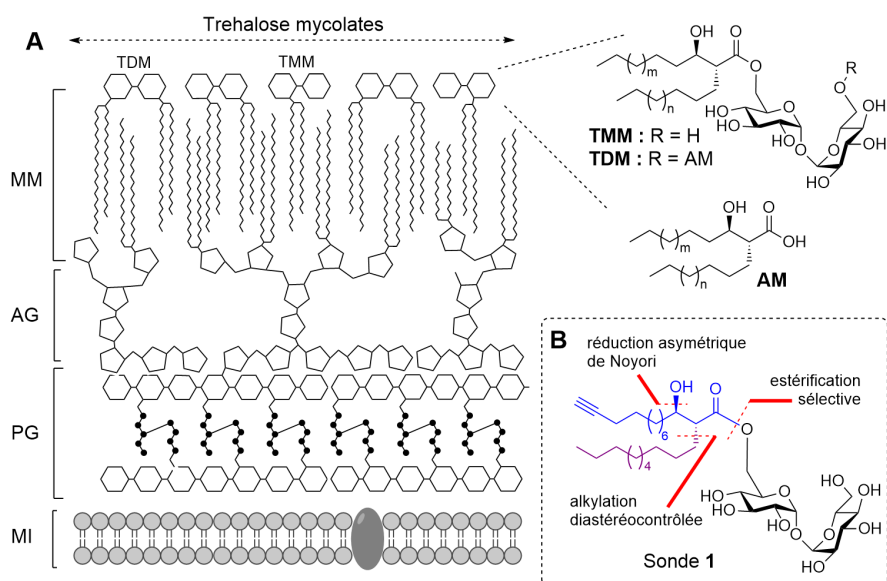


Figure 1 - A) Représentation schématique de la mycomembrane. B) Structure de la sonde bioorthogonale **1** (MM : mycomembrane ; AG : arabinogalactane ; PG : peptidoglycane ; MI : membrane interne).

Marquage métabolique

La sonde **1** a ensuite été utilisée pour réaliser des expériences de marquage métabolique sur des souches de *C. glutamicum*. Les bactéries sont cultivées en présence de l'analogue de TMM **1** dans le milieu de culture. À la fin de la culture, le milieu de culture est éliminé et les bactéries sont remises en suspension dans un milieu contenant un fluorophore dérivé de carboxyrhodamine comportant un groupement azoture permettant la réaction de chimie click. Les bactéries sont alors analysées par cytométrie de flux, ce qui permet de quantifier la fluorescence de chaque bactérie. L'histogramme regroupant les résultats montre clairement que les bactéries ayant été cultivées en présence de sonde ont incorporé l'agent fluorescent (figure 4A), indiquant que la sonde **1** est prise en charge dans le métabolisme bactérien comme un TMM naturel. Les bactéries ont également été observées en microscopie confocale (figure 4B). Les images obtenues montrent un marquage fluorescent des bactéries dû à l'incorporation de la sonde **1** dans les bactéries. Ce marquage est localisé au niveau

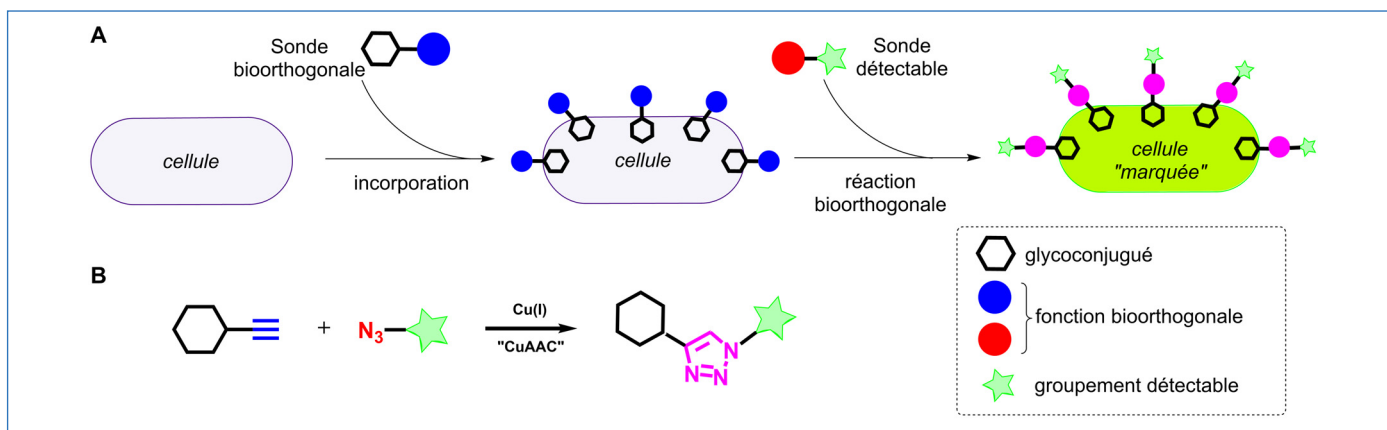


Figure 2 - A) Illustration du marquage métabolique par un rapporteur chimique via une réaction bioorthogonale. B) Réaction de cycloaddition entre un alcyne terminal et un azote (CuAAC).

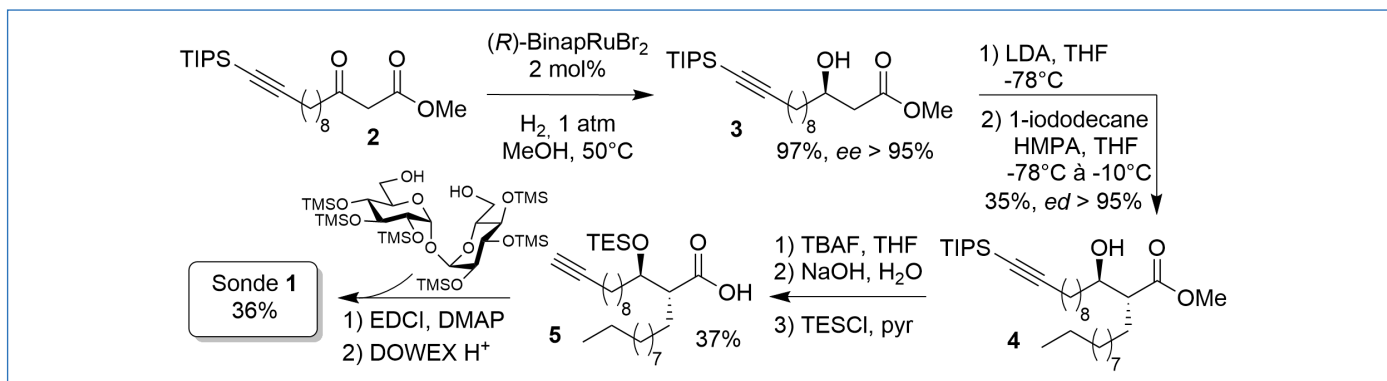


Figure 3 - Synthèse de la sonde bioorthogonale 1.

de la membrane et la fluorescence est plus importante au niveau des pôles et des septums (lieux de la division cellulaire, *figure 4C*) des bactéries, indiquant que les mycoloyltransférases seraient plus concentrées à ces endroits de la membrane. Par ailleurs, la sonde est bien spécifique des mycobactéries et n'est pas incorporée dans d'autres catégories de bactéries chez lesquelles le TMM est absent. En effet, lorsque des bactéries Gram-(+) et Gram(-), *B. subtilis* et *E. coli* respectivement, sont cultivées en présence de la sonde 1, aucun marquage n'est observé (*figure 4B*).

Vers de nouvelles cibles thérapeutiques

Nous avons mis au point la synthèse d'une sonde bioorthogonale dont la structure est très proche d'un glycolipide unique chez les mycobactéries, le TMM. La difficulté synthétique reposait notamment sur le contrôle de la stéréochimie de la partie lipidique ramifiée et l'introduction de la fonction alcyne bioorthogonale. Elle s'est révélée très efficace pour réaliser des expériences de marquage métabolique sur des cultures bactériennes et est prise en charge par les mycoloyltransférases présentes dans la mycomembrane de *C. glutamicum* [4]. Ces résultats très encourageants ne sont que les préliminaires d'une étude plus vaste dont le but est de comprendre la spécificité des mycoloyltransférases dans la biogenèse de la mycomembrane, avec à terme l'identification possible de nouvelles cibles thérapeutiques.

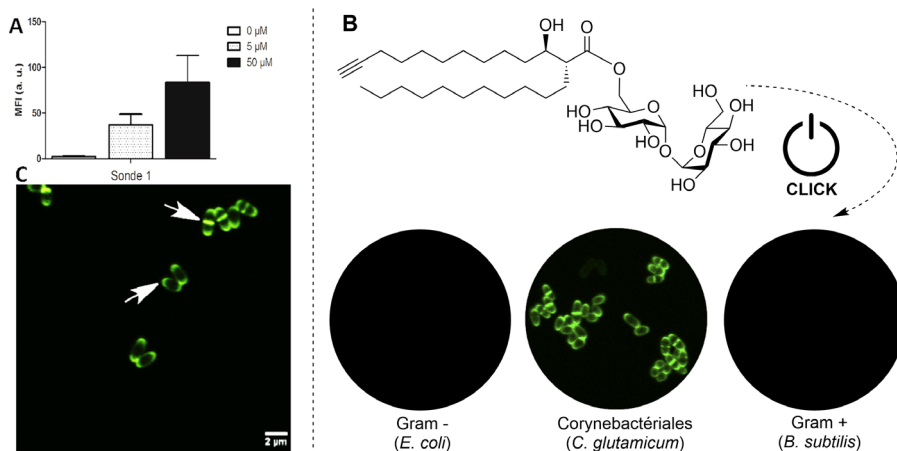


Figure 4 - A) Cytométrie. B) La sonde bioorthogonale 1 permet de marquer sélectivement les Corynebactériales ; images obtenues par microscopie de fluorescence. C) Zoom permettant de visualiser le marquage au niveau des pôles et septums chez *C. glutamicum*.

- [1] H.C. Hang, C.R. Bertozzi *et al.*, A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin-type O-linked glycosylation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2003**, *100*, p. 14846-851.
- [2] O. Kocaoglu, E.E. Carlson, Progress and prospects for small-molecule probes of bacterial imaging, *Nat. Chem. Biol.*, **2016**, *12*, p. 472-478 ; M. Kamariza, P. Shieh, C.R. Bertozzi, Imaging mycobacterial trehalose glycolipids, *Methods Enzymol.*, **2018**, *598*, p. 355-369.
- [3] R. Noyori *et al.*, Asymmetric hydrogenation of .beta.-keto carboxylic esters. A practical, purely chemical access to .beta.-hydroxy esters in high enantiomeric purity, *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, p. 5856-58.
- [4] E. Lesur, Y. Bourdreux *et al.*, First access to a mycolic acid-based bioorthogonal reporter for the study of the mycomembrane and mycoloyltransférases in *Corynebacteria*, *Chem. Commun.*, **2019**, *55*, p. 13074-077.

Cette fiche a été réalisée par **Emilie LESUR**, doctorante, et **Yann BOURDREUX**, maître de conférences à l'Université Paris-Saclay (Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay ; yann.bourdreux@universite-paris-saclay.fr).

Les fiches « Un point sur » sont coordonnées par Jean-Pierre FOULON (jpfoulon@wanadoo.fr). Elles sont regroupées et en téléchargement libre sur www.lactualitechimique.org.