

Développement de sondes fluorescentes pour le suivi du métabolisme de la proline chez les êtres vivants

Objectif du projet

Le métabolisme de la proline est en train d'émerger en tant que voie métabolique clé chez les êtres vivants.^[1] Des désordres du métabolisme de la proline peuvent conduire à des manifestations neurologiques sévères ou cancéreuses chez l'homme^[2] ainsi que dans certaines maladies parasitaires telles que la trypanosomiase.^[3] Chez les végétaux, il intervient au cours du développement, de la formation de la graine à la sénescence ou en réponse à des stress biotiques et abiotiques.^[4] La proline est synthétisée essentiellement à partir du glutamate (Fig. 1). Ce composé est d'abord phosphorylé puis réduit par la pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS) en glutamate semialdéhyde (GSA) en équilibre non enzymatique avec le pyrroline-5-carboxylate (P5C). Le P5C est ensuite réduit en proline par la P5C réductase (P5CR). L'oxydation de la proline en glutamate a lieu dans la mitochondrie et implique l'activité séquentielle de deux enzymes, la proline déshydrogénase (ProDH) et la P5C déshydrogénase (P5CDH). En présence de son cofacteur FAD, la ProDH oxyde la proline pour former le P5C en équilibre non enzymatique avec le GSA. La P5CDH utilise ensuite le NAD⁺ pour convertir le GSA en glutamate. La mesure de l'activité de ces enzymes est cruciale mais nécessite actuellement des méthodes biochimiques lourdes, la purification de mitochondries ou leur expression en systèmes hétérologues afin d'avoir des extraits enrichis en ces protéines.^[5,6] Par conséquent, **l'objectif de ce projet est de développer des sondes fluorescentes pour combiner sensibilité et fiabilité dans les tests de mesures d'activité d'enzymes du métabolisme de la proline *in vitro* et *in vivo***. Deux stratégies sont proposées pour cette étude. La 1^{re} stratégie consiste à générer des dérivés fluorescents du GSA issus de la réduction du glutamate par la P5CS ou de l'oxydation de la proline par la ProDH tandis que la 2^{de} stratégie consiste à utiliser des prolines modifiées en position C4 susceptibles de libérer des sondes fluorescentes lors de leur oxydation par la ProDH. Il s'agira ensuite de développer des méthodes de mesures de ces activités innovantes *in vitro* et *in vivo* à l'aide de ces sondes chez différents organismes.

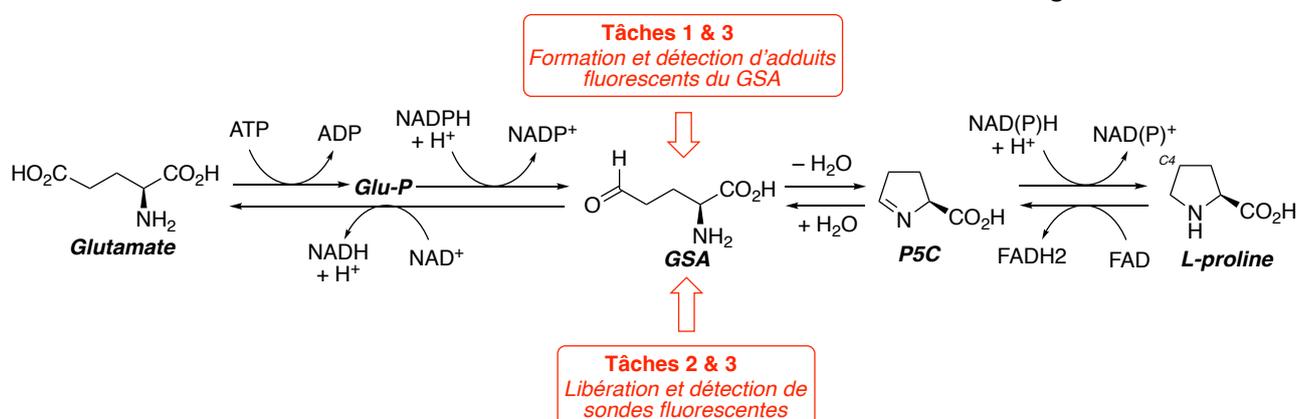


Fig. 1. Stratégies envisagées pour la détection par fluorescence des substrats ou produits du métabolisme de la proline.

Description du projet

Le projet s'articule autour de 3 tâches comprenant la synthèse d'adduits fluorescents du glutamate semialdéhyde (tâche 1), la synthèse de prolines greffées par des sondes fluorescentes (tâche 2), et la mise au point de méthodes de mesures innovantes des activités P5CS, P5CR, ProDH et P5CDH par fluorescence à l'aide des composés formés dans les tâches précédentes (tâche 3).

Tâche 1 : Synthèse du glutamate semialdéhyde et screening de sondes fluorescentes

Coordinateurs : Prof Franck Ferreira et Prof Arnould Savouré / Équipe : Dr Olivier Jackowski, Dr Sandrine Lanfranchi et Doctorant(e)

La stratégie 1 sera consacrée à la recherche de sondes fluorescentes du GSA. Un screening des sondes sera envisagé par dérivatisation du GSA sous forme d'imines et d'hydrazones fluorescentes via la réaction de sa fonction aldéhyde avec des amines ou des hydrazines. Les nombreux travaux récents sur la détection des aldéhydes dans l'atmosphère et dans différents milieux naturels offriront une large gamme de sondes

fluorescentes permettant d'atteindre cet objectif.^[7-11] Afin de réaliser ce screening, il sera tout d'abord nécessaire de synthétiser du GSA afin d'en disposer en suffisamment grande quantité. Parmi les synthèses décrites dans la littérature, celle utilisant l'hydroxylysine comme substrat de départ est très bien documentée^[12] et représente la voie d'accès la plus directe et la plus à même de permettre à l'équipe ROCS, qui a une expertise dans le domaine de la synthèse organique et de la manipulation des imines et de leurs dérivés,^[13] d'atteindre l'objectif de la tâche 1 (Fig. 2).

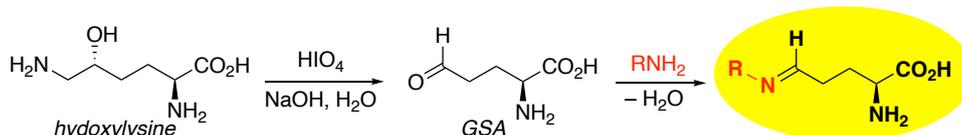


Fig. 2. Synthèse du GSA et screening de sondes fluorescentes.

Tâche 2 : Synthèse de prolines greffées par des sondes fluorescentes

Coordinateur : Prof Franck Ferreira / Équipe : Dr Olivier Jackowski et Doctorant(e)

La structure du site actif de la ProDH a été élucidée par cristallographie et modélisation chez les bactéries^[14] tandis que le développement d'alpha-fold permet maintenant d'avoir des modèles fiables des structures de ProDH humaine et d'Arabidopsis^[15] L'analyse du site de coordination d'inhibiteurs de cette enzyme a montré que des prolines substituées en position C4 devraient pouvoir y accéder et s'y fixer. Dans le cadre de ce projet, l'objectif sera d'introduire des groupements nucléofuges en position C4 susceptibles de libérer des espèces anioniques fluorescentes dans le milieu, après oxydation par la ProDH puis abstraction d'un proton par action d'un site basique de la poche enzymatique (Fig. 3). L'accessibilité au site actif des sondes sera étudiée en amont par des approches de docking à l'aide de logiciels disponibles en ligne et permettra d'optimiser le choix des sondes. La synthèse des prolines greffées en position C4 avec des groupements fluorophores dérivés par exemple de coumarines,^[16,17] de rhodamines,^[18] ou de quinazolinones,^[19] sera prise en charge par l'équipe ROCS. Elle sera menée à partir de la L-proline selon une séquence ne faisant appel qu'à des réactions classiques de la chimie organique.

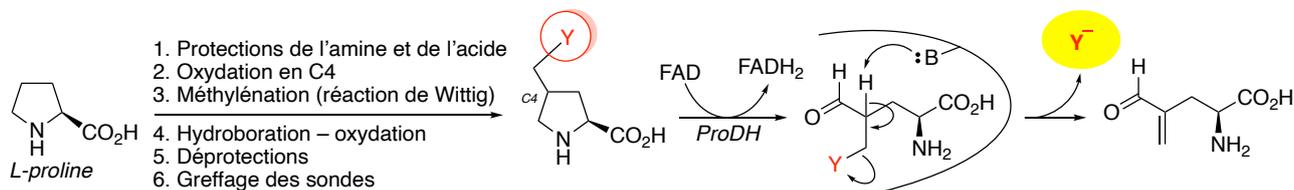


Fig. 3. Détection de la ProDH par fluorescence à partir de prolines greffées en position C4.

Tâche 3 : Mise au point de méthodes innovantes à l'aide de sondes fluorescentes pour la mesure de l'activité d'enzymes du métabolisme de la proline

Coordinateur : Prof Arnould Savouré / Équipe : Dr Sandrine Lanfranchi et Doctorant(e)

Les sondes produites par l'équipe ROCS seront testées *in vivo* et *in vitro* par l'équipe APCE. Ces sondes permettront la mesure de l'activité des enzymes P5CS, P5CR, ProDH et P5CDH par (i) fluorescence à partir des dérivés du GSA et, (ii) l'augmentation de la fluorescence dans le milieu biologique consécutive à l'oxydation de prolines modifiées en position C4. Les mesures d'activités P5CS, P5CR, P5CDH et ProDH sont déjà maîtrisées au laboratoire mais restent difficiles à mettre en œuvre car généralement très faibles.^[5,6] Les activités de ces enzymes à l'aide de sondes fluorescentes seront testées sur des protéines recombinantes puis dans des échantillons biologiques (tissus et/ou extraits) grâce à l'expertise de l'équipe APCE. Pour la première fois, des ProDH recombinantes d'Arabidopsis solubles ont été produites dans des systèmes bactériens et de levure.^[5] Pour ces études, différentes enzymes recombinantes de trypanosome (laboratoire du Dr F. Bringaud, Bordeaux), de l'homme (laboratoire de D. Campion, Rouen) et d'Arabidopsis (APCE) seront produites en système hétérologue afin de disposer de quantités suffisantes d'enzymes pour tester la pertinence des molécules synthétisées. Les protéines recombinantes ainsi obtenues seront purifiées par chromatographie d'affinité et leur activité testée. Ces sondes fluorescentes seront aussi testées sur des plantes ou des protoplastes perméabilisés afin de pouvoir mesurer l'activité de ces enzymes *in vivo*.

Positionnements national et international du projet

Ce projet associe l'expertise complémentaire et unique des équipes APCE et ROCS de Sorbonne Université dans les domaines du métabolisme de la proline et de la chimie organométallique de composés d'intérêt biologique pour le développement de biomarqueurs originaux et d'inhibiteurs de ce métabolisme. Le métabolisme de la proline fait actuellement l'objet de nombreuses études. Ainsi, il a été récemment montré qu'il est directement lié à certaines maladies parasitaires de l'homme (cycle de survie du Trypanosome chez la mouche tsé-tsé) mais aussi impliqué dans certaines formes d'hyperprolinémie chez l'homme en lien avec le cancer ou dans des troubles psychiatriques et cognitifs. Chez les plantes, il intervient dans leur adaptation aux changements climatiques et aux pathogènes. Le développement de biomarqueurs de ce métabolisme permettra le développement d'approches innovantes et non invasives pour étudier ces désordres proliniques par la mise au point de nouveaux tests de dépistage ou de diagnostic plus sensibles et plus rapides. La mesure de l'activité ProDH est actuellement basée sur l'oxydation de la proline et la réduction d'accepteurs d'électrons comme le 6-dichloroindophénol ou le cytochrome c sur des fractions mitochondriales purifiées.^[20] Ces tests ne sont pas suffisamment sensibles ni robustes pour être utilisés *in vivo* et pour du diagnostic médical. Nous proposons donc de nouveaux tests d'activité originaux de ces enzymes par fluorescence à l'aide d'adduits fluorescents (stratégie 1) et/ou de prolines modifiées (stratégie 2) qui permettraient de lever ces limitations. Une difficulté pourrait être rencontrée avec la non reconnaissance comme substrat des prolines modifiées par les ProDH, en revanche ces prolines modifiées pourraient alors constituer des inhibiteurs très intéressants de cette enzyme. Le développement d'adduits fluorescents du GSA est une stratégie très prometteuse qui n'est pas dépendante de la structure de l'enzyme. Les modèles végétaux et levures apparaissent particulièrement adaptés à la mise au point de ces tests (facilité d'induction de ces enzymes, disponibilité du matériel biologique) et permettront d'avoir une meilleure compréhension du rôle de ce métabolisme chez les êtres vivants ainsi que le développement de nouvelles cibles thérapeutiques contre notamment le cancer et certaines maladies parasitaires.

Formation et organisation du projet

Ce projet en co-encadrement permettra au doctorant d'acquérir une double compétence à l'interface de la chimie et de la biologie. Celle-ci sera un atout très important pour sa carrière future. Des réunions d'équipes communes seront organisées tous les 15 jours pendant lesquelles le doctorant présentera ses travaux. Elles permettront de faire le point sur l'état d'avancement du projet et d'identifier d'éventuel verrou à sa réalisation. Pendant ces trois ans, le doctorant aura la possibilité de s'inscrire à au moins un congrès international pour présenter ses travaux.

Bibliographie (en gras, publications des équipes)

[1] Alvarez et al. (2022) *Trends Plant Sci.* **27**, 39-55. [2] Yao et al. (2022) *Mol. Cells* **45**, 781-788. [3] Mantilla et al. (2017) *PLoS Pathog.* **13**, e1006158. [4] Dourmap et al. (2022) *J. Exp. Bot.* **erac499**. [5] Lebreton et al. (2020) *Front. Plant Sci.* **11**, 602939. [6] Parre et al. (2010) *Methods Mol Biol* **639**, 333-340. [7] Salahuddin et al. (2004) *Org. Biomol. Chem.* **2**, 1471-1475. [8] Chiang et al. (2016) *Org. Biomol. Chem.* **14**, 2186-2190. [9] Zhiqiang et al. (2016) *Chem. Asian J.* **11**, 818-822. [10] Aw et al. (2010) *Chem. Asian J.* **5**, 1317-1321. [11] Li et al. (2011) *Org. Biomol. Chem.* **9**, 7652-7654. [12] Vasek et al. (1976) *Anal. Biochem.* **74**, 430-440. [13] Ferreira et al. (2009) *Chem. Soc. Rev.* **38**, 1162-1186. [14] Tanner (2019) *Antioxid. Redox Signal.* **30**, 650-673. [15] Jumper et al. (2021) *Nature* **596**, 583-589. [16] Xing et al. (2011) *J. Fluoresc.* **21**, 587-594. [17] Uzu et al. (1990) *Analyst* **115**, 1477-1482. [18] Konarzycka-Bessler et al. (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 1418-1420. [19] Feuster et al. (2003) *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 16174-16175. [20] Schertl et al. (2014) *FEBS J.* **281**, 2794-2804.

Calendrier des tâches

Tâches	1 ^{re} année		2 ^e année		3 ^e année	
	6	12	18	24	30	36
Tâche 1	Synthèse d'adduits fluorescents du GSA – Doctorant(e)					
Tâche 2			Synthèse de prolines modifiées – Doctorant(e)			
Tâche 3	Production de protéines recombinantes		Mesure de l'activité des enzymes P5CS, P5CR, ProDH et P5CDH – Doctorant(e)			Rédaction doctorant(e)