



HAL
open science

Du microbiote humain à l'antibiotique de demain

Camille Herrou, Jeremy Mom, Ihsane Nasri, Elsa Turrini, Laurent Aussel

► **To cite this version:**

Camille Herrou, Jeremy Mom, Ihsane Nasri, Elsa Turrini, Laurent Aussel. Du microbiote humain à l'antibiotique de demain. *Médecine/Sciences*, 2022, 38 (5), pp.487-492. 10.1051/medsci/2022059 . hal-03714995

HAL Id: hal-03714995

<https://hal.science/hal-03714995>

Submitted on 11 Jul 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.

Du microbiote humain à l'antibiotique de demain

The human gut microbiota to find new antibiotics

Camille Herrou^{1*}, Jeremy Mom^{1*}, Ihsane Nasri^{1*}, Elsa Turrini^{1*}, Laurent Aussel²

¹Master 2 Microbiologie Intégrative et Fondamentale, Aix Marseille Université, Marseille, France.

²Aix Marseille Université, CNRS, LCB UMR, 7283, IMM, Marseille, France.

camille.herrou@etu.univ-amu.fr

jeremy.mom@etu.univ-amu.fr

ihsane.nasri@etu.univ-amu.fr

elsa.turrini@etu.univ-amu.fr

aussel@imm.cnrs.fr

*Ces quatre auteurs ont participé de façon égale au travail

Le microbiome intestinal est le lieu où coexistent et évoluent près de 100 000 milliards de microorganismes dont 800 à 1000 espèces bactériennes différentes, mais également des archées¹, des eucaryotes² et des virus. Chez les mammifères, il assure des fonctions nutritionnelles, détoxifiantes et de support au développement du système immunitaire, essentielles au maintien de l'homéostasie intestinale. Ces fonctions lui confèrent une importance comparable à celle d'un organe.

Apparu comme « l'empreinte digitale » de chaque individu, le microbiote intestinal est cependant composé d'espèces bactériennes dominantes communes à tous les êtres humains et appartenant à deux phyla majoritaires : les bacteroidetes et les firmicutes [1]. Parmi les firmicutes, les ruminocoques sont très étudiés car certaines souches possèdent l'avantage d'être cultivables en laboratoire, contrairement à la majorité des bactéries du microbiote. Les ruminocoques sont retrouvés chez 90 % des individus sains et sont connus pour leur intérêt nutritionnel et protecteur [2]. De plus, la mise en évidence d'une activité antibactérienne de certaines souches de cette famille contre des bactéries pathogènes suscite un fort intérêt dans le domaine de la recherche clinique, dans un contexte où l'émergence des résistances aux antibiotiques constitue un problème de santé publique majeur. Ainsi, les composés à l'origine de cette activité antibactérienne pourraient s'ajouter à d'autres alternatives aux antibiotiques comme la phagothérapie. Cette nouvelle reprend quelques-uns des travaux qui ont permis la caractérisation de ces molécules chez *Ruminococcus gnavus*.

¹ Exemple : *Methanobrevibacter smithii*, archée méthanogène que l'on retrouve chez 4 individus sur 5.

² Exemple : *Candida albicans*, champignon microscopique peuplant l'intestin de 50% des individus sains.

Découverte d'une activité antibactérienne chez *R. gnavus* E1

L'omniprésence de *R. gnavus* dans la majorité des microbiomes humains en fait un microorganisme d'intérêt dans la recherche clinique. La souche E1 de *R. gnavus*, qui peut être isolée à partir de fèces humaines, établit une relation de symbiose avec le tube digestif. Du côté de l'hôte, la bactérie présente un intérêt nutritionnel via la production d'enzymes essentielles au métabolisme alimentaire [2]. Elle possède également un intérêt protecteur et assure la maturation du mucus intestinal en dégradant les glycoprotéines qui le composent. Du côté de la bactérie, la dégradation des glycoprotéines et éléments nutritifs présents dans les intestins de l'hôte favorisent sa capacité à coloniser le milieu.

Par ailleurs, dans les années 90, une activité anti-*Clostridium perfringens* (anti-Cp) fut détectée dans les fèces de rats mono-colonisés avec *R. gnavus* E1 [3]. De façon étonnante, cette activité était absente lorsque ces mêmes bactéries étaient cultivées seules *in vitro*. L'ajout de trypsine pancréatique dans le milieu de culture a permis de rétablir cette activité antibactérienne, suggérant une relation hôte-symbionte (Figure 1). Pour appuyer ce résultat, des expériences *in vivo* utilisant des rats mono-colonisés avec la souche E1 en présence de trypsine exogène ont été réalisées. Celles-ci ont permis de confirmer la nécessité de la trypsine pour l'activité antibactérienne de *R. gnavus* E1 contre *C. perfringens* [3]. Les molécules responsables de cette activité anti-*Clostridium* ont par la suite été purifiées et caractérisées.

Caractérisation des ruminococcines

En effet, les progrès en matière de séquençage, de clonage et de purification de protéines ont permis l'identification et la caractérisation des molécules à l'origine de cette activité antibactérienne. Il s'agit de bactériocines, peptides antimicrobiens ayant la particularité d'être synthétisés par voie ribosomale.

La ruminococcine A (RumA) est la première des bactériocines sécrétée par *R. gnavus* E1 à avoir été mise en évidence, une dizaine d'années après la découverte de l'activité anti-Cp [4]. RumA a été purifiée à partir de cultures *in vitro* de *R. gnavus* E1 par des techniques de chromatographie visant à séparer les constituants d'un mélange en fonction de leur polarité. La séquence peptidique de RumA a été caractérisée, permettant l'identification d'acides aminés Dhb (dehydrobutyrine) et Lan (lanthionine), caractéristiques de la classe des lantibiotiques³. Ces derniers, avec les labyrinthopeptides⁴ et les sactipeptides⁵, constituent la classe I des bactériocines ayant pour cible principale les bactéries Gram positives. Plus particulièrement, RumA possède une activité antibactérienne contre les souches phylogénétiquement proches de *R. gnavus* et également contre différentes espèces du genre *Clostridium*. Elle ne présente, en revanche, aucune activité contre des bactéries Gram négatives [4]. Cette activité est dépendante de la trypsine. Un modèle de régulation propose qu'un peptide inducteur sécrété par *Ruminococcus gnavus* soit clivé par la trypsine pour être activé. Ce peptide inducteur active alors une cascade de régulation menant à l'activation de

³ Peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement.

⁴ Bactériocines de classe I contenant de la labionine, un acide aminé carbacyclique modifié de manière post-traductionnelle.

⁵ Bactériocines de classe I caractérisées par la présence d'une liaison thioéther entre le soufre d'une cystéine et le carbone α d'un autre acide aminé. Cette liaison est essentielle aux propriétés chimiques de ce type de peptide.

la transcription du gène *rumA*. [5] (Figure 1). Il a ensuite fallu attendre plus de dix ans et le développement de la production hétérologue (production chez *Escherichia coli*) de RumA pour analyser précisément sa structure et montrer la présence dans le peptide de trois ponts thioéther caractéristiques des ruminococcines et essentiels à son bon repliement [6].

La caractérisation de RumA et la mise en évidence de son rôle de peptide antimicrobien, associées aux progrès des techniques de purification, ont facilité la caractérisation d'autres bactériocines produites par *R. gnavus* E1. En effet, des études génomiques ont montré que le contenu des fèces provenant de rats mono-colonisés par *R. gnavus* E1 présentait une activité anti-*C. perfringens* directement corrélée à une forte expression du régulon *rumC*⁶. La ruminococcine C (RumC) étant produite uniquement *in vivo*, dans l'intestin de l'hôte, il a fallu une dizaine d'années pour déterminer les conditions de production de cette bactériocine et procéder à sa purification à partir de contenus caecaux humains : après plusieurs étapes de chromatographie, les fractions possédant une activité anti-Cp ont été analysées par spectrométrie de masse, révélant la présence de 5 isoformes de RumC possédant toutes 4 ponts thioéther, caractéristiques du groupe des sactipetides [7, 8].

Par la suite, afin de mieux caractériser le processus de biosynthèse ainsi que la structure de l'une de ces isoformes, RumC1, un système d'expression hétérologue chez *Escherichia coli*, a été développé. La mutagenèse dirigée de RumC1 ainsi que l'utilisation de la chromatographie en phase liquide associée à la spectrométrie de masse ont permis d'identifier les acides aminés impliqués dans la formation des ponts thioéther : Ala12, Asn16, Arg34, et Lys42 (Figures 1 et 2) [8, 9]. L'obtention de la forme

⁶ Ensemble de gènes impliqués dans la production de la ruminococcine C.

mature de RumC1, contenant 4 ponts thioéther essentiels à l'activité antibactérienne, dépend de l'activité d'une SAM-sactisynthase⁷, RumMc1. Cette enzyme permet la formation d'une structure en double épingle à cheveux particulière à ce sactipeptide (Figure 2). De plus, la maturation de RumC1 conduisant à la production de la forme active implique deux clivages protéolytiques successifs : un premier clivage du peptide signal par la métallopeptidase RumPc, puis un second clivage des 5 résidus en N-terminal par la trypsine présente dans le milieu extracellulaire (Figure 1). Ce dernier clivage est indispensable à l'activité anti-Cp de RumC1 [8].

Malgré un mécanisme d'action encore mal compris, l'analyse du spectre d'activité de RumC1 a permis de mettre en lumière une efficacité contre les espèces pathogènes du genre *Clostridium* et plus particulièrement *Clostridium perfringens*, mais aussi contre d'autres bactéries Gram positives telles que *Staphylococcus aureus*, bactérie multirésistante aux antibiotiques [8] (Figure 2). Il a également été montré que RumC1 pouvait générer une activité antifongique contre certains Basidiomycètes *in vitro* [10]. Par ailleurs, des tests de cytotoxicité sur des cellules intestinales et des explants iléocaecaux humains ont montré que RumC1 n'affectait pas la viabilité des cellules et n'induisait pas d'hémolyse des érythrocytes.

Ainsi, l'activité antimicrobienne exercée par RumC1 et l'absence d'effet néfaste pour les cellules eucaryotes font de ce sactipeptide un candidat intéressant pour une utilisation en tant qu'agent thérapeutique. En effet, RumC1, naturellement produit au sein du microbiote humain, pourrait constituer une alternative aux antibiotiques utilisés pour traiter les infections gastro-intestinales. La production de RumC1 recombinante fonctionnelle en laboratoire constitue l'un des enjeux importants pour une future production industrielle de cette bactériocine. Cependant, ce projet pourrait faire face à

⁷ Enzyme à radical-S-adenosylmethionine (SAM) qui catalyse la formation de pont thioéther en une étape, par un mécanisme faisant intervenir un radical libre.

de nombreuses limites liées notamment aux coûts de production de ce composé qui sont à ce jour très élevés par rapport aux antibiotiques disponibles sur le marché. Néanmoins, la simplification du processus de maturation de ce peptide, via la production de mimétiques de synthèse par exemple (voir entretien avec Michael Lafond), pourrait faciliter le développement de RumC1 comme nouvel antibiotique issu du microbiote intestinal.

Les ruminococcines, de nouveaux agents thérapeutiques

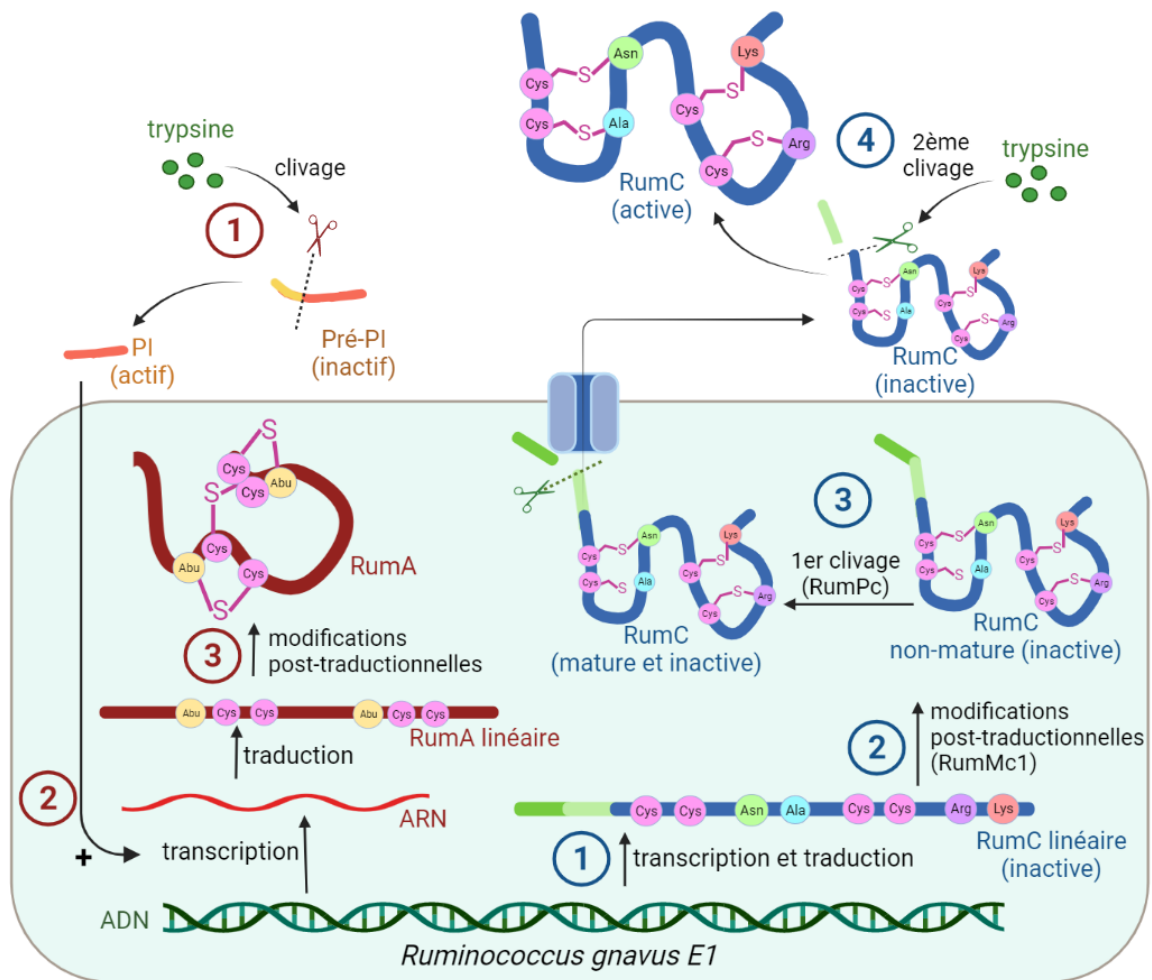
Trente années d'étude des ruminococcines, bactériocines produites par *R. gnavus*, ont permis la découverte de leur activité anti-Cp et leur caractérisation structurale et fonctionnelle. Ces connaissances ont été permises grâce à des avancées technologiques considérables, notamment en matière de production et d'expression hétérologue des protéines, mais également en matière de purification et de résolution structurale. Ces bactériocines possèdent une activité antibactérienne contre des bactéries pathogènes Gram positives, dont certaines sont résistantes aux antibiotiques telles que *Staphylococcus aureus*. De plus, les premiers travaux utilisant des cultures bactériennes de *C. perfringens* exposées de façon itérative à ces ruminococcines n'ont, jusqu'ici, pas mis en évidence de mécanismes de résistance qui seraient développés par les bactéries cibles. L'ensemble de ces données font des ruminococcines des candidats prometteurs pour le développement de nouveaux antibiotiques. En outre, au-delà de l'activité antibactérienne et l'intérêt des ruminococcines en tant qu'antibiotique, ces peptides pourraient participer de manière bénéfique aux interactions hôte-microbiote. En effet, il a été montré que RumC1 jouait un rôle multifonctionnel dans un contexte commensal (Figure 1) agissant aussi bien comme une molécule favorisant la régénération des tissus que comme un anti-

inflammatoire [10]. Ce peptide joue également le rôle d'inhibiteur de la formation des biofilms, mode de croissance qui favorise l'apparition d'infections bactériennes. Ces effets multifonctionnels de RumC1 sur l'hôte soulignent l'importance des ruminococcines et suggèrent une multitude d'applications cliniques possibles pour cette famille de composés.

Références

1. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiol.* 2009 ; 9 : 123.
2. Lafond M, Tauzin A, Bruel L, *et al.* α -Galactosidase and Sucrose-Kinase Relationships in a Bi-functional AgaSK Enzyme Produced by the Human Gut Symbiont *Ruminococcus gnavus* E1. *Front. Microbiol.* 2020 ; 11 : 579521.
3. Ramare F, Nicoli J, Dabard J, *et al.* Trypsin-dependent production of an antibacterial substance by a human *Peptostreptococcus* strain in gnotobiotic rats and in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993 ; 59 : 2876-83.
4. Dabard J, Bridonneau C, Phillippe C, *et al.* Ruminococcin A, a new lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain isolated from human feces. *Appl. environ. microbiol.* 2001 ; 67 : 4111-18.
5. Gomez A, Ladiré M, Marcille F, *et al.* Trypsin mediates growth phase-dependent transcriptional regulation of genes involved in biosynthesis of ruminococcin A, a lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain from a human intestinal microbiota. *J. Bacteriol.* 2002 ; 184 : 18-28.
6. Ongey E.L, Giessmann R.T, Fons M, *et al.* Heterologous biosynthesis, modifications and structural characterization of Ruminococcin-A, a lanthipeptide from the gut bacterium *Ruminococcus gnavus* E1, in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2018 ; 9 : 1688.
7. Pujol A, Crost E.H, Simon G, *et al.* Characterization and distribution of the gene cluster encoding RumC, an anti-*Clostridium perfringens* bacteriocin produced in the gut. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011 ; 78 : 405-15.
8. Chiumento S, Roblin C, Kieffer-Jaquinod S, *et al.* Ruminococcin C, a promising antibiotic produced by a human gut symbiont. *Sci. Adv.* 2019 ; 5 : eaaw9969.

9. Roblin C, Chiumento S, Bornet O, *et al.* The unusual structure of Ruminococcin C1 antimicrobial peptide confers clinical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2020 ; 117 : 19168-77.
10. Roblin C, Chiumento S, Jacqueline C, *et al.* The Multifunctional Sactipeptide Ruminococcin C1 Displays Potent Antibacterial Activity In Vivo as Well as Other Beneficial Properties for Human Health. *Int. J. Mol. Sci.* 2021 ; 22 : 3253.



Created in BioRender.com bio

Figure 1 : Modèle de synthèse et de maturation de RumaA et RumC.

Les ruminococcines RumaA et RumC sont synthétisées et maturées selon deux mécanismes distincts. Les différentes étapes de synthèse et de maturation de RumaA (en rouge) et RumC (en bleu) sont indiquées par des numéros. La transcription de *rumA* est activée par un peptide inducteur (PI) après clivage de ce dernier par la trypsine présente dans le milieu extracellulaire (produite par l'hôte). RumC est produite dans la cellule sous forme inactive, puis subit une première étape de clivage du peptide signal par RumPc. Une fois sécrétés, les 5 résidus en N-terminal de RumC sont clivés

par la trypsine présente dans le milieu extracellulaire, ce qui résulte en la production de la forme active du sactipeptide RumC. *Figure créée avec BioRender.*

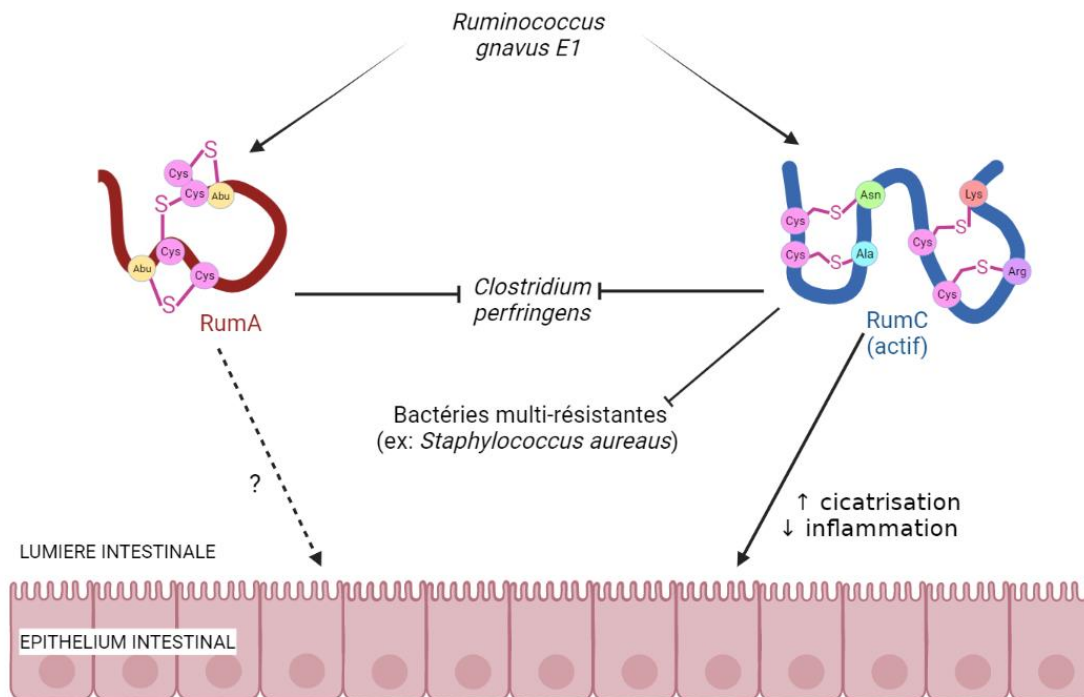


Figure 2 : Relations entre *Ruminococcus gnavus* E1 et l'hôte dans le cadre de la production de ruminococcines.

Ruminococcus gnavus E1 produit et sécrète plusieurs bactériocines, dont RumA et RumC. Ces deux peptides subissent des étapes de maturation intracellulaires qui permettent de former des ponts thioéther au sein de leur structure tridimensionnelle. Les résidus cystéine, donneurs de soufre pour les liaisons thioéther, sont représentés en rose. Les autres résidus impliqués dans la formation des ponts covalents au sein des formes matures de RumA et RumC sont indiqués en couleur. Ces deux bactériocines possèdent une activité anti-bactérienne contre différentes espèces dont certaines bactéries multi-résistantes. Les mécanismes qui restent à démontrer sont représentés par les flèches en pointillés. *Figure créée avec BioRender.*