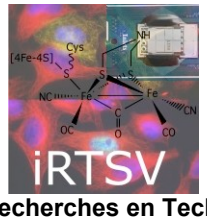


**Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant**

## Soutenance de thèse

**Vendredi 30 septembre 2011**

**À 13 h 30 - Salle de séminaires de l'IBS, Grenoble**

Par **Djeneb Camara** – iRTSV/LPCV

# Étude de la voie de biosynthèse du folate : caractérisation biochimique et recherche d'inhibiteurs de la formation de l'acide *p*-aminobenzoïque

Le terme folate (vitamine B9) désigne une famille de molécules ayant une structure de base composée de 3 parties : un noyau pterine, un acide para-aminobenzoïque (pABA) et une chaine de glutamates. Le rôle de ces cofacteurs est de transporter des groupements monocarbonés. Ils interviennent dans de nombreuses réactions comme la synthèse des bases nucléiques, la synthèse de méthionine et la synthèse et le turnover de la S-adenosylmethionine. Le folate est synthétisé chez les plantes et un grand nombre de micro-organismes dont les parasites du phylum des apicomplexes, tels que *Plasmodium falciparum*, et *Toxoplasma gondii*. Les enzymes impliquées dans cette voie de biosynthèse étant absentes chez l'homme, elles représentent des cibles herbicides, antibiotiques et antiparasitaires potentielles. Les inhibiteurs de la voie de biosynthèse du folate (tels que les sulfamides, analogues du pABA et inhibiteurs de la dihydroptéroate synthase, ou les inhibiteurs de la dihydrofolate réductase), sont souvent utilisés comme antibiotiques et antiparasitaires. Un problème majeur dans le traitement de ces maladies infectieuses est la résistance développée contre ces molécules, ce qui nécessite la recherche permanente de nouveaux médicaments.

Le pABA est synthétisé en plusieurs étapes qui sont autant de cibles intéressantes pour développer de nouveaux inhibiteurs. Tout d'abord l'aminodeoxychorismate (ADC) synthase transforme le chorismate en ADC, puis dans une seconde étape, l'ADC est transformé en pABA par une ADC lyase. Chez les plantes supérieures et les parasites apicomplexes l'ADC synthase est une enzyme bifonctionnelle composée de deux grands domaines, un domaine glutamine amidotranferase (GAT) qui permet de produire le $NH_3$ nécessaire à l'amination du chorismate, et un domaine ADC synthase (ADCS). Nous avons pu déterminer les paramètres cinétiques de la GAT-ADCS d'*Arabidopsis*. Nous avons constaté que ces deux domaines fonctionnent indépendamment, c'est-à-dire soit en présence de glutamine seule pour le domaine GAT (pas de chorismate), soit en présence de chorismate et de $NH_3$ pour le domaine ADCS (pas de glutamine). Toutefois, le fonctionnement en tandem des deux domaines (tous les substrats sont présents) améliore les propriétés cinétiques ($k_{cat}$) de chacun d'eux. Nos résultats montrent aussi que le NH3 produit par le domaine GAT et nécessaire à la synthèse de l'ADC n'est pas relargué dans le milieu extérieur mais canalisé (channeling) vers le domaine ADCS. Finalement, nous avons observé que l'ADC, produit final de la réaction, retro-inhibe le domaine ADCS en absence d'ADC lyase. Pris dans son ensemble, nos résultats indiquent que l'amination du chorismate est l'étape la plus limitante de la synthèse du pABA,..

Des expériences de criblage à haut débit nous ont permis d'identifier une molécule, la rubreserine, qui inhibe *in vitro* le domaine GAT de la GAT-ADCS d'*Arabidopsis* avec un *Ki* autour de 8 µM. Nous avons observé que cette molécule inhibe la croissance de plantules d'*Arabidopsis thaliana* et la prolifération des parasites *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium falciparum* avec des $IC_{50}$ respectif de 65 µM, 20 µM et 1 µM. Chez *Arabidopsis*, la concentration en folate des cellules traitées est abaissée d'environ 40% par rapport au contrôle, une diminution qui n'a plus lieu en présence de pABA. L'ajout de pABA et de 5-formyltetrahydrofolate dans les milieux de culture d'*Arabidopsis* ou de *Toxoplasma* supprime en grande partie l'inhibition de croissance liée à la rubreserine, ce qui montre bien la connexion entre rubreserine et voie de biosynthèse du folate. Avec *Toxoplama gondii*, la rubreserine apparait plus efficace que les sulfamides pour bloquer l'invasion et la prolifération de ces parasites dans les fibroblastes humains. Ces résultats valident la GAT-ADCS comme cible anti-folate et montrent que la rubreserine a des propriétés anti-parasitaires intéressantes.