

Abstract

The resurgence of microbial infections associated with the increasing emergence of antibiotic resistant strains and the lack of new antibiotics have escalated quickly to become one of the major threats in Public Health nowadays. In that context, new molecules with antibacterial activity are actively searched. Ribosomally synthesized and Post-translationally modified Peptides (RiPPs) are a potential trove of such alternatives to antibiotics. One of the prominent members of the human gut microbiome, *Ruminococcus gnavus*, produces various antibacterial RiPPs designated as Ruminococcins. The focus of my thesis project was the Ruminococcin C (RumC) which is synthesized in the form of several variants by the strain E1, exclusively in the context of symbiosis within an animal host. During this project, a purification protocol to extract the various isoforms of RumC from cecal contents of *R. gnavus* E1 mono-associated rats was developed. On one hand, their mass spectroscopic characterization classified them as sactipeptides as all the isoforms exhibit four thioether bridges linking the sulfur atom of a cysteine to the alpha carbon of an acceptor amino acid residue. Mutagenesis analysis and structural resolution of the RumC1 isoform revealed that it belongs to a new family of sactipeptides with a previously undescribed three-dimensional structure. On the other hand, the biological characterization of RumC1 demonstrated its promising potential as a therapeutic agent. First, RumC1 shows potent activity towards Gram-positive pathogens including multi-drug resistant clinical strains in vitro. Secondly, treatment with RumC1 successfully rescued mice infected with *Clostridium perfringens* from a lethal infection. Finally, RumC1 displays drug-like features such as resistance to proteolytic, physical, and chemical treatments; safety for human tissues; low propensity for resistance selection and higher affinity for bacterial than eukaryotic cells. It is worth noting that the lack of these drug-like features is often limiting the clinical development of RiPPs. Hence, RumC1 appears to be a good candidate for drug development as alternatives to antibiotics. Preliminary results on the mode of action of RumC1 revealed that it inhibits ATP synthesis and - most likely as a consequence - the synthesis of DNA, RNA, proteins and peptidoglycan. Currently, investigations are ongoing to identify the precise molecular target of RumC1 which could support and enhance the development of a therapeutic agent.

Keywords: RiPPs, sactipeptides, bacteriocins, antibiotics, *Ruminococcus gnavus* E1, human gut microbiome.

Résumé

La recrudescence des maladies infectieuses associée à l'émergence croissante de souches résistantes aux antibiotiques et au manque de nouveaux antibiotiques s'est rapidement intensifiée au point de devenir une des menaces majeures de Santé Publique. Dans ce contexte, de nouvelles molécules avec des activités antimicrobiennes sont activement recherchées. Les peptides synthétisés par voie ribosomale et modifiés post-traductionnellement (RiPPs) constituent un vaste réservoir d'alternatives potentielles aux antibiotiques. Un des membres proéminents du microbiote intestinal humain, *Ruminococcus gnavus*, produit divers RiPPs antibactériens nommés Ruminococcines. Mon projet de thèse a porté sur les Ruminococcines C (RumC) qui sont synthétisées sous formes de plusieurs isoformes par la souche E1, et ce uniquement dans un contexte symbiotique avec un hôte animal. Au cours de ce projet, un protocole d'extraction des différentes isoformes de RumC a été établi à partir de contenus caecaux de rats mono-colonisés par *R. gnavus* E1. D'un côté, leur caractérisation par spectrométrie de masse a permis de les classer comme sactipeptides puisque toutes les isoformes ont montré la présence de quatre ponts thioéther entre l'atome de soufre d'une cystéine et le carbone alpha d'un acide aminé accepteur. Des analyses de mutagenèse et structurale de RumC1 ont de plus révélé une structure tridimensionnelle inédite, attribuant cette isoforme à une nouvelle famille de sactipeptides. D'un autre côté, la caractérisation biologique de RumC1 a démontré son potentiel prometteur en tant qu'agent thérapeutique. En effet, RumC1 possède in vitro une forte activité antibiotique contre des pathogènes à Gram-positif, y compris contre des souches cliniques multi-résistantes. De plus, le traitement avec RumC1 de souris infectées, sur un modèle de péritonite létale à *Clostridium perfringens*, a montré son efficacité d'éradication du pathogène. Enfin, RumC1 présente des caractéristiques propres et indispensables aux développements de médicaments comme la résistance à des traitements protéolytique ou physico-chimique ; une absence de toxicité sur tissus humains ; une faible propension à générer de la résistance ; et une affinité supérieure pour les cellules procaryotes qu'eucaryotes. Il est à noter que l'absence de ces propriétés est souvent une des limitations du développement clinique des RiPPs. Par conséquent, RumC1 semble être un bon candidat pour le développement d'alternatives aux antibiotiques. Des résultats préliminaires sur le mode d'action de RumC1 ont montré qu'elle inhibe la synthèse d'ATP et – probablement par conséquence – d'ADN, d'ARN, de protéines et du peptidoglycane. L'identification de la cible moléculaire précise de RumC1 est en cours, ce qui permettrait de promouvoir et perfectionner le développement d'un agent thérapeutique.

Mots clés : RiPPs, sactipeptides, bactériocines, antibiotiques, *Ruminococcus gnavus* E1, microbiote intestinal humain.