

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

**THESE**

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I  
en Science de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

**Jean ENGOHANG NDONG**

Le 23 Octobre 2003

---

**Mécanismes génétiques de l'activation de la pro-drogue  
éthionamide chez les mycobactéries.**

---

**Jury**

Pr. Philippe DELANNOY, Lille I	Président
Pr. Michel SIMONET, Lille II	Rapporteur
Dr. Jean-Marc REYRAT, CR INSERM, HDR	Rapporteur
Pr. Bertrand M'BATCHI, USTM	Examineur
Dr. Alain R. BAULARD, CR INSERM	Examineur
Dr. Camille LOCHT, DR INSERM	Directeur de thèse

A mes parents,  
à mon épouse,  
à mes enfants : Valène, Angie et Loulou,  
à tantine Stéphanie et tonton Philippe.

## Remerciements

Je voudrais avant tout remercier Dieu le Père pour la force qu'il m'a donnée de surmonter toutes les difficultés rencontrées au cours de ma thèse de doctorat et de produire le présent manuscrit.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à tous les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font d'évaluer mon travail de thèse.

Un grand merci à Camille de m'avoir accepté dans son laboratoire. Un grand merci pour ses conseils et ses encouragements.

Alain, un simple merci ne suffit pas pour moi pour exprimer ma reconnaissance envers toi. Pendant ces presque 4 années écoulées, tu as été parfois plus qu'un tuteur de thèse, tu as été un grand frère. Malheureusement, l'Académie Française n'a pas prévue de mot supérieur à « merci » pour dire combien je te suis reconnaissant. Merci pour le recul scientifique que tu m'as permis de développer et pour la confiance que tu m'as accordée en me laissant la plus grande latitude possible pendant la réalisation de ma thèse. Je t'encourage à faire de même pour tes prochains thésards et je te souhaite une bonne chance pour ton HDR. Encore merci.

Je voudrai remercier Véro pour son accueil, pour sa disponibilité et pour sa sensibilité. Merci à Kévin et Sylvie pour l'aide particulière qu'ils ont apporté à ma famille et à moi-même. Merci à Julie, Lulu et Sylvia pour les corrections d'orthographe. Un grand merci à Anne-so. D., Fanny, Loïc, Céline, Nath-Nath, Nath-Pat, Cyril, Hélène pour leur gentillesse et pour des services de toutes sortes.

Merci à Eve, pour les gels de séquence et la 2D , à Domi pour tous les services et particulièrement lorsque j'avais des soucis en informatique, à Françoise, Odile et Martin pour leur gentillesse.

Merci également à tous ceux de l'U447 que je n'ai pas cités nommément. Merci de m'avoir tous soutenu aussi bien moralement que matériellement parfois.

Tous mes remerciements à mes parents pour l'éducation qu'ils m'ont inculquée. Merci à tantine Stéphanie et à tonton Philippe pour leurs mots d'encouragement et leur soutien matériel.

Merci à tous mes amis pour leur soutien moral.

Je voudrais enfin remercier Charlotte, Angie et Loulou pour des heures passées à m'attendre. Merci pour votre compréhension et votre bienveillance. Merci pour le soutien et l'amour dont vous me comblez et dont vous me témoignez à chaque instant.

**Abréviations**

ACP	Protéine porteuse d'acyle ( <i>acyl carrier protein</i> )
AM	Arabinomannane
ARNpol	ARN polymérase
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
CoA	Co-enzyme A
EMB	Ethambutol
ETH	Ethionamide
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FAS	Synthase d'acides gras ( <i>Fatty acid synthase</i> )
FMO	Monooxygénase contenant une flavine ( <i>flavin-containing monooxygenase</i> )
HTH	Hélice-tour-hélice
INH	Isoniazide
kDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomannane
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAP	Nitroimidazopyrane
NO	Oxyde nitrique
NOI	Radicaux azotés
AODC	Oléate-albumine-dextrose-catalase
pb	paire de base
P <sub>ethA</sub>	Région contenant le promoteur de <i>ethA</i>
POA	Acide pyrazinoïque
PZA	Pyrazinamide
QAC	Composé quaternaire d'ammonium
ROI	Radicaux oxygénés
TB-MDR	Souches de <i>M. tuberculosis</i> multirésistantes aux drogues
TDM	Thréhalose dimycolate
TLM	Thiolactomycine
TMM	Thréalose monomycolate
VIH	Virus d'immunodéficience humaine
VB	Virginiae butanolide
VS	Virginiamycine S

## Sommaire

<b>Etude bibliographique</b> .....	1-69
Introduction générale.....	1
I – Les mycobactéries.....	4
I.1 – Identification.....	5
I.2 – Taxonomie.....	5
I.2.1. – Mycobactéries à croissance lente.....	6
I.2.2. – Mycobactéries à croissance rapide.....	8
II – La tuberculose.....	10
II.1 – L’infection par <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	11
II.2 – Pathogenèse moléculaire et cellulaire de <i>M. tuberculosis</i> .....	13
II.2.1 – Interaction entre mycobactéries et cellules épithéliales (pneumocytes).....	13
II.2.2 – Interaction entre mycobactéries et macrophages.....	13
II.2.3 – Mécanismes de persistance des mycobactéries.....	15
II.3 – Réaction de l’hôte face à l’invasion par <i>M. tuberculosis</i> .....	17
II.3.1 – Les ROI, le NO et les RNI.....	17
II.3.2 – Immunité cellulaire médiée par les lymphocytes T.....	19
II.3.3 – Le granulome.....	19
III – L’enveloppe cellulaire de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	21
III.1 – La membrane plasmique et le pseudo-périplasme.....	23
III.2 – La paroi mycobactérienne.....	24
III.3 – La capsule.....	25
III.4 – Biosynthèse des acides mycoliques.....	27
III.4.1 – Synthèse de la chaîne courte d’acide gras : chaîne $\alpha$ et amorces de la chaîne de méromycolate.....	27
III.4.2 – Le système FAS-II et la synthèse de la chaîne $\beta$ (méromycolate).....	28

---

III.4.3 – Modification de la chaîne de méromycolate et la condensation de type Claisen.....	29
III.4.5 – Le complexe antigène 85 et l'activité mycolyltransférase.....	30
IV – Lutte contre la tuberculose.....	31
IV.1 – Vaccination contre la tuberculose.....	32
IV.1.1 – Le vaccin <i>M. bovis</i> BCG.....	32
IV.1.2 – Développement de nouveaux vaccins.....	34
IV.2 – La chimiothérapie.....	36
IV.2.1 – Les antituberculeux de première ligne.....	36
IV.2.2 – Les antituberculeux de seconde ligne.....	37
IV.2.3 – Les nouveaux antituberculeux, un enjeu pour le futur.....	38
IV.2.4 – Stratégie de l'OMS : concept DOTS.....	39
V – Les antimycobactériens dirigés contre la paroi.....	41
V.1 – La pyrazinamide.....	42
V.2 – L'éthambutol.....	43
V.3 – L'isoxyl.....	44
V.4 – La thiolactomycine.....	44
V.5 – L'isoniazide.....	45
V.6 – L'éthionamide.....	47
VI – Régulation transcriptionnelle.....	49
VI.1 – L'ARNpol et les facteurs sigma.....	50
VI.2 – Les facteurs sigma mycobactériens.....	52
VI.3 – La régulation positive.....	54
VI.3.1 – L'activation de l'opéron lactose.....	55
VI.3.2 – Régulation de l'acquisition du phosphate.....	57
VI.4 – La régulation négative.....	58
VI.4.1 – Réponse SOS.....	59
VI.4.2 – Régulation de l'acquisition du fer par IdeR.....	60
VI.4.3 – Les répresseurs de la famille TetR/CamR.....	61
VI.4.3.a – Régulateurs modulant la synthèse des pompes à efflux : cas de TerR, QacR et BarA/VarR.....	62

VI.4.3.b – Régulateurs contrôlant la production de certaines enzymes du métabolisme : CamR, AguR et McbR.....	66
VI.4.3.c – Contrôle de la virulence : Mce3R.....	68
VI.4.3.d – PsaA, régulateur du facteur $\sigma^s$ (RpoS).....	69
<b>Contexte scientifique et objectifs de la thèse.....</b>	<b>70-71</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>72-116</b>
Chapitre I.....	72
Régulation de l'activation de la pro-drogue ethionamide chez les mycobactéries.....	73
Article 1 : <i>Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria.....</i>	<i>75</i>
Chapitre II.....	81
II.1 – EthR, un répresseur de la famille TetR/CamR impliqué dans la résistance à l'éthionamide chez les mycobactéries octamérise de manière coopérative sur son opérateur.....	82
Article 2 : <i>EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerises cooperatively on its operator.....</i>	<i>85</i>
II.2 – Autorégulation de ethR et influence de facteurs environnementaux sur l'expression de ethR et de ethA.....	108
II.2.1 – Introduction.....	108
II.2.2 – Matériel et méthodes.....	108
II.2.3 – Résultats et discussion.....	110
Chapitre III.....	111
Caractérisation biochimique et structurale du régulateur EthR.....	112
III.1 – Introduction.....	112
III.2 – Matériel et méthodes.....	112
III.3 – Résultats et discussion.....	114
<b>Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>116-124</b>

**Références bibliographiques**.....125-139



# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

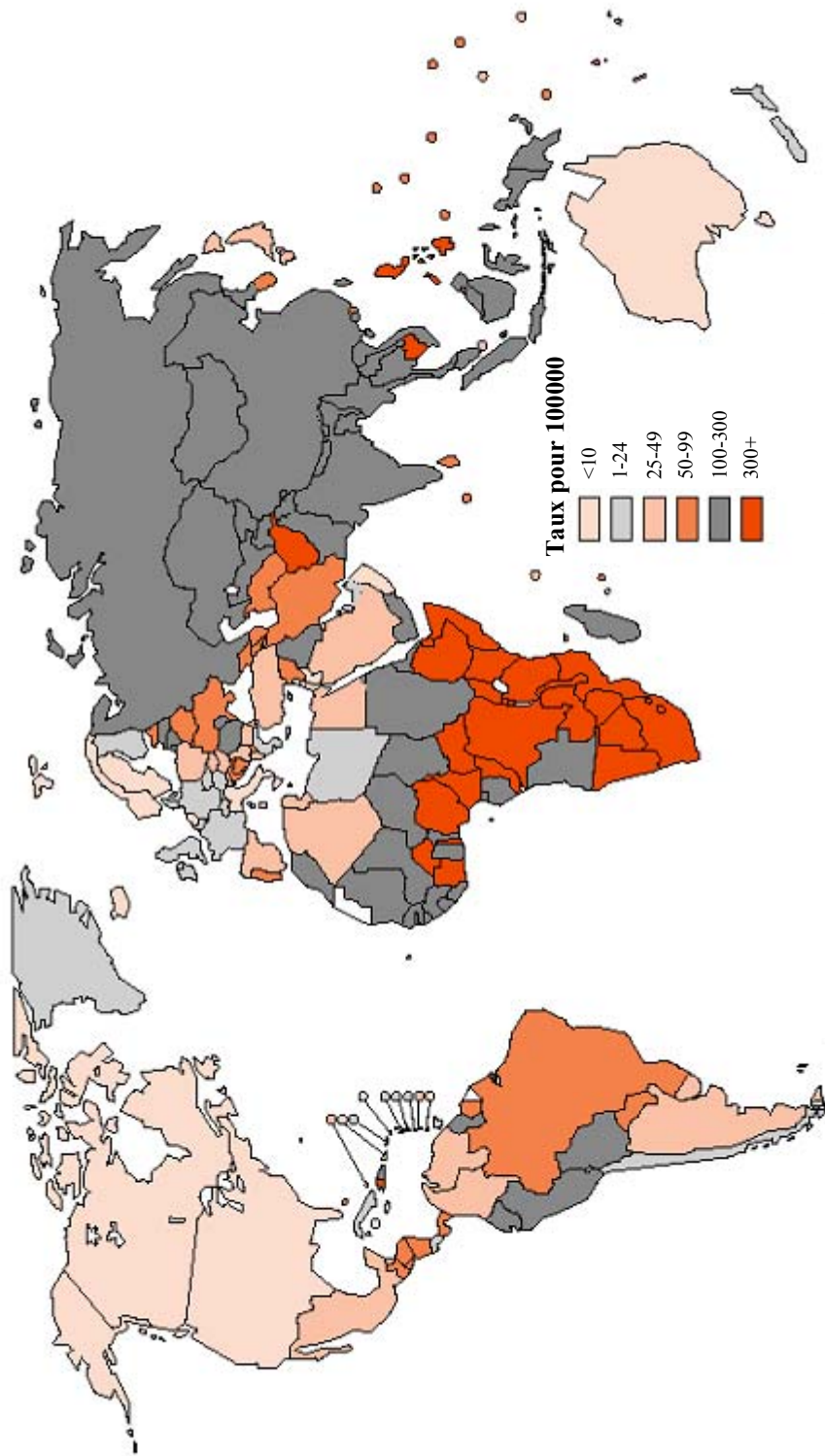
## **INTRODUCTION GENERALE**

## Introduction générale

Connue depuis l'antiquité, la tuberculose, que l'on appelle aussi phtisie, peste blanche, écrouelle ou consommation est bien caractérisée : fièvre modérée mais continue, perte progressive des forces et de poids, toux, crachats sanglants, aspect final d'un cadavre vivant avec des pommettes saillantes, les yeux enfoncés et brillants. Il faut cependant attendre 1865 pour que le médecin français Jean-Antoine Villemin démontre le caractère contagieux de la tuberculose en infectant des lapins à partir de crachats de patients atteints de consommation. Puis c'est en 1882 que l'allemand Robert Koch isole *Mycobacterium tuberculosis* à partir de lésions pulmonaires de patients tuberculeux et démontre de manière formelle que cette bactérie est l'agent étiologique de la maladie.

Bien qu'incurable il y a encore deux ou trois générations, la tuberculose a vu son pronostic se transformer radicalement avec l'apparition des antibiotiques (la streptomycine en 1944, l'isoniazide en 1952, la rifampicine en 1966). La mise au point par Albert Calmette et Camille Guérin du vaccin vivant atténué *Mycobacterium bovis* BCG en 1921 a permis une bonne prévention de certaines formes de la maladie. L'amélioration générale du niveau de vie et le respect grandissant des règles élémentaires d'hygiène ont également fortement participé au recul de ce fléau. Le déclin de la tuberculose s'est poursuivi jusqu'aux environs de l'année 1985, puis le nombre des cas de tuberculose enregistrés a recommencé à augmenter régulièrement aussi bien en Europe, aux Etats-Unis (Bloom & Murray, 1992 ; Kaufmann & van Embden, 1993) que dans le reste du monde. Face à l'ampleur de la recrudescence de la tuberculose à travers le monde, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a, en 1993, classé cette maladie au rang des principales infections réémergentes (Bloom & Murray, 1992 ; WHO, 2000).

Aujourd'hui, avec environ 3 millions de décès par an, la tuberculose reste la première cause de mortalité liée à un agent infectieux unique (WHO, 2001). Le rapport 2001 de l'OMS estime à environ 8,4 millions le nombre de nouveaux cas de tuberculose apparus en 1999. Actuellement, près d'un tiers de la population mondiale est infectée par le bacille de Koch. Toutefois, seuls 5 à 10 % de personnes infectées développeront effectivement une phase clinique de la tuberculose et ce risque est augmenté dans des proportions considérables en cas d'infection associée au VIH (Gazzard, 2001 ; WHO, 2001). En effet, l'immunodéficience provoquée par ce virus rend les personnes atteintes sensibles aux



**Figure 1** : carte représentant l'incidence de la tuberculose dans le monde en 2000.

infections par *M. tuberculosis*, par d'autres bacilles tuberculeux tel que *Mycobacterium avium* ainsi que par des mycobactéries non tuberculeuses. Ainsi, une étude récente révèle que près de 50 % de personnes séropositives pour le VIH sont également infectées par *M. tuberculosis* (Gazzard, 2001). Les régions où le SIDA est endémique sont celles qui enregistrent la progression la plus importante des nouveaux cas de tuberculose, avec une augmentation quasi exponentielle pour l'Afrique sub-saharienne (WHO, 2001). La pandémie de la tuberculose touche principalement les régions du sud-est asiatique (3 millions de cas), du pacifique (plus de 2 millions de cas) et de l'Afrique sub-saharienne (1,5 millions de cas) (WHO, 2000). Dans les pays développés, malgré la disponibilité de moyens de prévention et d'anti-tuberculeux puissants, on enregistre encore plus de 250.000 nouveaux cas de tuberculose chaque année (WHO, 2000). La figure 1 illustre l'incidence de la tuberculose dans le monde en 2000. Les facteurs qui contribuent à la recrudescence de la tuberculose sont à ce jour bien connus : les écarts toujours croissants dans les niveaux de développement, l'effondrement des infrastructures de santé publique, la pauvreté, l'urbanisation anarchique, les conflits civils, les changements et dégradations de l'environnement et la mondialisation des voyages et des échanges commerciaux. Enfin, l'usage à mauvais escient des antibiotiques est un paramètre supplémentaire à l'origine d'une épidémie rendue complexe par l'apparition de souches parfois résistantes à la majorité des antituberculeux disponibles. Ainsi, chez les personnes économiquement défavorisées, les cas de tuberculose sont de façon générale diagnostiqués tardivement, à un stade où la charge bactérienne est importante et où la maladie est difficile à traiter.

Afin de contrecarrer la recrudescence de ce fléau mondial, des axes de recherche prioritaires ont été définis. Parmi ces axes de recherche, les plus importants sont :

- la recherche de nouveaux vaccins pour une meilleure prévention de la maladie,
- la recherche de nouvelles méthodes diagnostiques,
- la recherche de nouvelles molécules antimycobactériennes,
- la compréhension du mode d'action des antimycobactériens et des mécanismes moléculaires pouvant conduire à la résistance de certaines souches de *M. tuberculosis*. Certains antituberculeux étant relativement toxiques pour le patient infecté par *M. tuberculosis*, il est également nécessaire de redéfinir les conditions d'utilisation de ces antituberculeux de manière à réduire les risques d'apparition d'effets indésirables.

## **I – LES MYCOBACTERIES**

**Tableau 1** : Division du genre *Mycobacterium*. Classification des mycobactéries à croissance lente et des mycobactéries à croissance rapide. D'après Michael Goodfellow and Lawrence G. Wayne, 1982.

Mycobactéries à croissance lente		Mycobactéries à croissance rapide	
<i>M. tuberculosis</i> *	complexe <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. fortuitum</i> *	complexe <i>M. fortuitum</i>
<i>M. bovis</i> */**		<i>M. chelonae</i> *	
<i>M. africanum</i> *		<i>M. abscessus</i> *	
<i>M. microti</i> **			
<i>M. avium</i> */**	complexe <i>M. avium</i>	<i>M. agri</i>	espèces (non photochromogéniques)
<i>M. intracellulare</i> *		<i>M. chitae</i>	
<i>M. Xénopi</i> */**		<i>M. smegmatis</i>	
<i>M. scrofulaceum</i> *	complexe <i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. parafortuitum</i>	complexe <i>M.</i> <i>parafortuitum</i>
<i>M. simiae</i>		<i>M. aurum</i>	
<i>M. gordonae</i>	complexe <i>M. gordonae</i>	<i>M. diernhoferi</i>	
<i>M. szugai</i>		<i>M. neoaurum</i>	
<i>M. asiaticum</i>		<i>M. vaccae</i>	
<i>M. kansasii</i> *	complexe <i>M. kansasii</i>	<i>M. flavescens</i>	thermotolérants et espèces associés
<i>M. gastri</i>		<i>M. phlei</i>	
<i>M. terrae</i>	complexe <i>M. terrae</i>	<i>M. thermoresistibile</i>	
<i>M. nonchromogenicum</i>		<i>M. farcinogenes</i> **	agents responsables de la farcy bovine
<i>M. triviale</i>		<i>M. senegalense</i> */**	
<i>M. marinum</i> *	espèces additionnelles n'exigeant pas des condi- tions de croissance spéciales	<i>M. duvalii</i>	espèces additionnelles (scotochromogéniques)
<i>M. ulcerans</i> */**		<i>M. gadium</i>	
<i>M. malmoense</i> *		<i>M. gilvum</i>	
<i>M. paratuberculosis</i> **	espèces requérant des conditions de croissance spéciales	<i>M. komossense</i>	
<i>M. haemophilum</i> *			
<i>M. lepraemurium</i> **			
<i>M. leprae</i> *			

\*mycobactéries pathogènes pour l'homme.

\*\*mycobactéries pathogènes pour l'animal.

# I – Les mycobactéries

## I.1 – Identification

*M. tuberculosis* fut la première espèce du genre *Mycobacterium* à être observée en microscopie photonique par Robert Koch en 1882. Les mycobactéries sont des bacilles de 1 à 6 µm de long et de 0,3 à 0,6 µm de diamètre (Draper, 1982) qui peuvent parfois former des amas bactériens ramifiés ou filamenteux. Les filaments mycobactériens diffèrent de ceux des actinomycètes car ils se fragmentent rapidement en bacilles isolés et en corps coccoïdes lorsqu'ils sont perturbés. D'autre part, il est courant d'observer des variations de taille et de forme non seulement entre différentes espèces mais aussi entre individus d'une même espèce, en fonction des conditions de croissance. Les mycobactéries sont des bactéries aérobies facultatives.

Les mycobactéries sont difficilement colorées par les colorants usuels. Par contre, baignées à chaud dans la fuchsine phéniquée selon la méthode de Ziehl-Neelsen, les bacilles retiennent le colorant malgré l'action combinée d'acide dilué et d'alcool (acido-alcool-résistance), apparaissant alors comme de fins bâtonnets rouges. La coloration de Ziehl-Neelsen est liée à la composition chimique singulière de l'enveloppe des mycobactéries (Barksdale & Kim, 1977 ; Jenkins *et al.*, 1982). Cette coloration est bien spécifique des actinomycetales dont les mycobactéries, mais elle ne permet cependant pas de préciser s'il s'agit d'une mycobactérie pathogène ou atypique. La coloration de Gram révèle que les mycobactéries sont des bactéries à Gram positif.

## I.2 – Taxonomie

Seul genre connu de la famille des mycobacteriaceae, *Mycobacterium* appartient à la branche des actinomycetales. Les caractéristiques standards des membres du genre *Mycobacterium* sont :

- l'acido-alcool-résistance (Barksdale & Kim, 1977),



- la présence d'acides mycoliques contenant de 60 à 90 atomes de carbone clivables par pyrolyse en esters méthylés de C22 à C26 et
- un contenu de l'ADN en Guanine + Cytosine (G+C) de 61 à 71 % (Levy-Frebault & Portaels, 1992).

Le genre *Mycobacterium* compte plus de 70 espèces (Brosch *et al.*, 2000) reconnues ou proposées sur base des caractéristiques standards. Toutefois, ce chiffre demeure certainement bien inférieur à la réalité.

Les mycobactéries peuvent être séparées en deux grands groupes en fonction de leur vitesse de croissance à température optimale (Shinnick & Good, 1994) (tableau 1). Les mycobactéries à croissance lente ont un temps de génération supérieur à vingt heures et nécessitent donc plus de 7 jours d'incubation sur milieu solide pour former une colonie visible. A l'opposé, les mycobactéries à croissance rapide présentent un temps de génération qui varie entre 4 heures et 6 heures, nécessitant ainsi moins de 7 jours pour former une colonie visible sur milieu solide.

Saprophytes pour la plupart, les mycobactéries vivent en général dans l'eau et dans le sol. Cependant, un certain nombre de mycobactéries sont des pathogènes stricts ou des pathogènes opportunistes pour l'homme et pour l'animal. Les pathogènes de l'homme et de l'animal sont généralement des espèces à croissance lente à l'exception des mycobactéries opportunistes des complexes *Mycobacterium fortuitum* et *Mycobacterium senegalense*. Néanmoins, beaucoup d'espèces mycobactériennes représentent un risque infectieux pour les individus immunodéprimés.

Pour lutter contre les infections mycobactériennes dues à des pathogènes stricts ou opportunistes, il nous apparaît nécessaire de connaître les agents étiologiques le mieux possible. Dans les deux sous-chapitres qui vont suivre, nous allons brièvement parler de la plupart des mycobactéries pathogènes et des mycobactéries opportunistes.

### **I.2.1. – Mycobactéries à croissance lente**

Le complexe *M. tuberculosis* regroupe les 4 espèces pathogènes *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *Mycobacterium microti* et *Mycobacterium africanum*. Ces bacilles sont responsables de tuberculose humaine et animale (Good, 1992), à l'exception de *M. microti* qui est inoffensif pour l'homme immunocompétent (Shinnick & Good, 1994). Les membres

du complexe *M. tuberculosis* présentent une similitude de séquence nucléotidique supérieure à 95 % (Baess, 1979).

*M. avium* est responsable de la tuberculose aviaire, mais parfois aussi de la tuberculose bovine ou de la tuberculose porcine. L'infection par *M. avium* d'une personne non immunodéprimée est rare et souvent confondue avec celle provoquée par l'espèce voisine *Mycobacterium intracellulare*. Ces deux espèces, avec *Mycobacterium xenopi* sont englobées sous l'appellation MAC (*M. avium complex*). Ce complexe est rarement impliqué dans des pathologies chez l'homme sain, mais il est cependant responsable d'infections pulmonaires et d'infections non pulmonaires chez des personnes immunodéficientes.

*Mycobacterium paratuberculosis* et *Mycobacterium lepraemurium* sont associées à des formes de tuberculoses animales et sont actuellement considérées comme des sous-espèces de *M. avium*.

*Mycobacterium leprae* ou bacille de Hansen est un parasite intracellulaire obligé. Il est responsable de la lèpre chez l'homme et se confine majoritairement dans les cellules de la peau, les testicules et les nerfs périphériques (Gelber, 1994). Actuellement, aucune souche de *M. leprae* n'est cultivable *in vitro*. Toutefois, il est possible de cultiver *M. leprae* en infectant directement des animaux. Des études des séquences d'ARNr 16S de *M. leprae* montrent que sur l'arbre phylogénétique cette mycobactérie est proche des branches de *Mycobacterium kansasii*-*Mycobacterium scrofulaceum*-*M. avium*. Environ 50 % du génome de *M. leprae* contient des séquences non codantes et l'examen minutieux de ces séquences montre que celles-ci correspondent à des pseudogènes dont les gènes équivalents demeurent fonctionnels chez *M. tuberculosis* (Brosch, *et al.*, 2000). L'identification de *M. leprae* est basée sur la présence de bacilles acido-résistants sur une lésion de peau.

*Mycobacterium ulcerans* est l'agent causal de l'ulcère de Buruli. Cette maladie de la peau est rencontrée surtout dans des régions tropicales (Afrique et Australie). Le nombre de cas d'ulcère de Buruli a considérablement augmenté en Afrique de l'ouest ces dix dernières années. *M. ulcerans* est aujourd'hui la troisième infection humaine due aux mycobactéries après celles provoquées par *M. tuberculosis* et *M. leprae* (Asiedu *et al.*, 2000). Bien que *M. ulcerans* soit une espèce difficile à cultiver en laboratoire du fait de l'absence d'un milieu synthétique disponible, ce bacille est néanmoins cultivable en infectant directement des organismes vivants tels que la souris et le tatou au niveau de la peau. Une étude a récemment montré que l'insecte aquatique Naucoridae est un vecteur de *M. ulcerans*. Cette étude indique que *M. ulcerans* est capable de survivre et se multiplier dans les glandes salivaires

de l'insecte sans causer de dommages à celui-ci et qu'il est possible d'infecter des souris saines à partir des glandes salivaires de l'insecte infesté (Marsollier *et al.*, 2002).

Isolé de poissons malades, *Mycobacterium marinum* peut provoquer chez l'humain des lésions cutanées suite à l'abrasion des coudes, genoux ou doigts, subie en bassin à poissons. Généralement, la maladie s'éteint spontanément au bout de quelques mois (Wayne & Kubica, 1986).

Bien que capable de provoquer une maladie pulmonaire chronique et des infections non pulmonaires chez l'homme immunodéprimé, *M. kansasii* n'est pas considéré comme transmissible à un individu sain.

*Mycobacterium malmoense* est associé à certaines infections pulmonaires et extrapulmonaires. En Suède, de 1968 à 1989, 221 cas d'infection à *M. malmoense* ont été enregistrés (Henriques *et al.*, 1994).

### **I.2.2. – Mycobactéries à croissance rapide**

Bien que les mycobactéries à croissance rapide soient en large majorité non pathogènes, certaines espèces sont cependant responsables d'infections qui peuvent parfois être très graves aussi bien pour l'humain que pour l'animal.

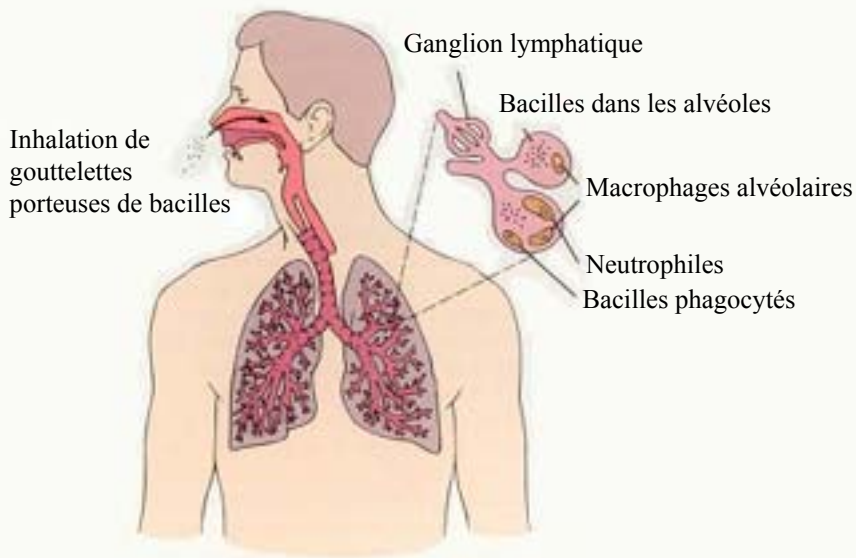
La plupart des maladies humaines causées par les mycobactéries à croissance rapide concernent les membres du complexe *Mycobacterium fortuitum* (*M. fortuitum*, *Mycobacterium abscessus* et *Mycobacterium chelonae*). Ces mycobactéries peuvent provoquer des méningites, des endocardites, des ostéomyélites, des maladies pulmonaires ou des abcès (Daley & Griffith, 2002 ; Ingram *et al.*, 1993 ; Wayne & Sramek, 1992).

*Mycobacterium senegalense* et *Mycobacterium farcinogenes* sont responsables de la maladie infectieuse chronique du zébu encore connue sous le nom de farcy bovine (Hamid *et al.*, 2002). Cette maladie endémique est surtout répandue en Afrique de l'Est et en Afrique Centrale, notamment au Tchad, au Nigeria, en Somalie, au Sénégal et au Soudan. La farcy bovine était à l'origine attribuée à *Nocardia farcinica*, mais les nouvelles techniques d'identification ont permis de conclure que *M. senegalense* et *M. farcinogenes* sont les principaux agents étiologiques de cette maladie (Hamid *et al.*, 2002).

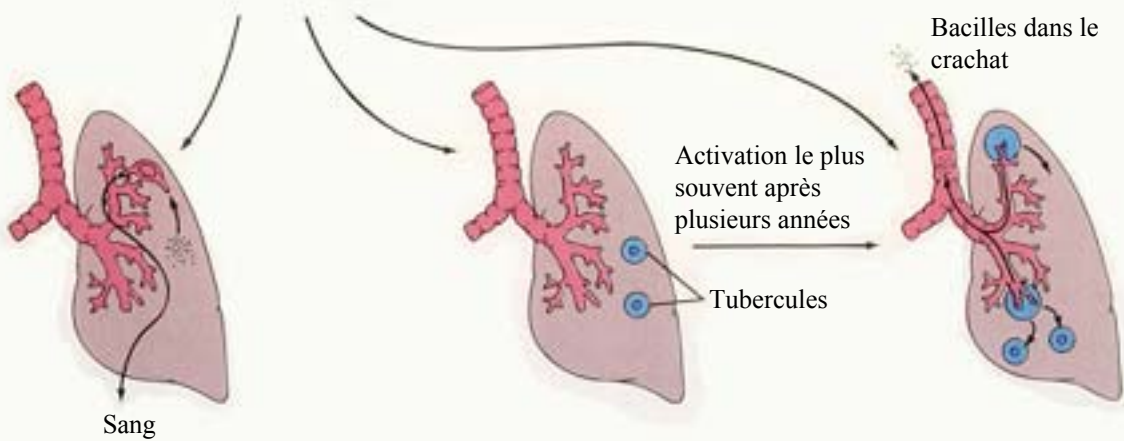
Un intérêt particulier a été porté à *Mycobacterium smegmatis* ces dernières années. Facile à cultiver en laboratoire, cette mycobactérie est très rarement associée à des pathologies humaines ou animales. Par ailleurs, une souche hautement électrotransformable

a été isolée (Snapper *et al.*, 1990). Cette souche, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 constitue aujourd'hui un organisme modèle d'étude de l'élaboration de l'enveloppe mycobactérienne, de la résistance aux antibiotiques, ou pour la mise au point d'outils de biologie moléculaire transposables aux mycobactéries pathogènes.

## **II – LA TUBERCULOSE**



(a) Infection primaire



(b) Tuberculose disséminée. Extension de la tuberculose dans tout le corps.

(c) Tuberculose latente. La plupart des individus restent dans cet état pendant toute leur vie et n'en souffrent pas.

(d) Tuberculose active. Une extension lentement progressive de tubercules avec érosion dans les conduits à air et les vaisseaux sanguins. Ces individus sont infectieux.

**Figure 2** : évolution d'une tuberculose non traitée chez l'homme.

## II – La tuberculose

Parmi les infections mycobactériennes, la tuberculose est celle qui provoque le plus de décès dans le monde suivie de loin par la lèpre et l'ulcère de buruli. S'il est vrai que des mesures strictes d'hygiène peuvent à elles seules permettre de faire reculer considérablement le nombre de cas de lèpre et d'ulcère de buruli, la lutte contre la tuberculose reste par contre relativement complexe du fait de son caractère hautement contagieux. *De facto*, il est urgent de renforcer la lutte contre la tuberculose en prenant en compte chaque aspect déterminant de la propagation et de la persistance de la maladie. Il existe au moins trois moyens de contrôle de la tuberculose : la *vaccination*, la *chimiothérapie* et l'*amélioration des conditions de vie*. Ce dernier critère est aux mains d'enjeux économique-politiques hors de propos dans ce texte. Les deux autres points seront abordés au chapitre IV. En outre, il est évident qu'une lutte efficace contre la tuberculose passe par une connaissance approfondie du mode d'infection, de multiplication et de propagation de l'agent étiologique de la maladie. Ces aspects seront abordés dans les paragraphes qui suivent.

### II.1 – L'infection par *M. tuberculosis*

La transmission de *M. tuberculosis* d'un être humain à un autre se fait par inhalation de fines gouttelettes expectorées par le malade et contenant quelques bacilles tuberculeux (figure 2). Il est également possible que l'homme contracte la tuberculose à partir d'espèces animales et de leurs produits tel que le lait.

Après leur entrée dans les voies respiratoires, les bacilles se logent dans les alvéoles pulmonaires et s'y multiplient activement. Chez les personnes immunocompétentes, les bacilles sont alors englobés dans un amas de lymphocytes, de macrophages et de tissu conjonctif. Au cours de cette réponse d'hypersensibilité, se forment des nodules caractéristiques, petits et durs, appelés *tubercules* et à l'origine du nom de l'affection. Dans environ 95 % des cas, le processus pathologique s'arrête à ce stade. Ainsi, seules 5 % des personnes infectées se montreront incapables de circonscrire l'infection et développeront une tuberculose active. Cette différence de sensibilité à la maladie est un phénomène qui

demeure encore mal connu. Il est cependant établi qu'au moins trois facteurs peuvent influencer le devenir d'une infection par *M. tuberculosis* :

- *le statut immunitaire* : des observations cliniques montrent que les individus immunodéprimés développent plus facilement la tuberculose à partir d'une réactivation de *M. tuberculosis* en phase de dormance ou à partir d'une nouvelle infection (Daley *et al.*, 1992 ; Havlir & Barnes, 1999).

- *La malnutrition*, notamment des régimes alimentaires pauvres en protéines et en micro-nutriments tels que les vitamines A et D entraînent facilement des sujets infectés par *M. tuberculosis* vers la phase clinique d'infection active. Cette observation est renforcée par de récents travaux qui indiquent une évolution plus rapide de l'infection chez des souris carencées en protéines (Chan *et al.*, 1996). En revanche, un enrichissement des régimes alimentaires de ces animaux permet de retarder considérablement la progression de l'infection (Chan *et al.*, 1996).

- *Des facteurs génétiques* peuvent également prédisposer des sujets infectés par *M. tuberculosis* à évoluer vers la phase clinique de la tuberculose. Ainsi, des études montrent que des individus possédant une mutation dans le gène codant la protéine de résistance à l'association du macrophage avec le bacille (NRAMP1, *Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1*) ont une susceptibilité accrue à l'infection par l'agent étiologique de la tuberculose (Ma *et al.*, 2002).

Avec le temps, les tubercules peuvent prendre une consistance caséuse (*caséification*) et peuvent évoluer vers la calcification. Ces nodules appelés *complexes de Ghon* se révèlent facilement à la radiographie du poumon. Cette calcification permet d'emprisonner les bacilles désormais incapables de se multiplier. Chez les sujets infectés qui ne développent pas de phase aiguë, l'infection s'arrête après calcification des lésions primaires. L'infection va par contre progresser chez des individus plus sensibles. Les lésions tuberculeuses vont se liquéfier et former des cavernes tuberculeuses propices au développement de nouveaux foyers d'infection capables de se répandre vers d'autres organes.

Après la primo infection, *M. tuberculosis* peut persister dans l'organisme hôte grâce à sa capacité à entrer en dormance. Les sujets ayant une tuberculose latente présentent un test tuberculinique positif, mais ne possèdent aucun symptôme de la tuberculose. Les mycobactéries peuvent rester en dormance pendant plusieurs années, voire toute la vie de l'hôte et se réactiver en cas de déficit du système immunitaire de l'hôte infecté. A ce jour, les signaux et les mécanismes de réactivation de *M. tuberculosis* sont encore mal connus.



## ***II.2 – Pathogenèse moléculaire et cellulaire de *M. tuberculosis****

*M. tuberculosis* est un microorganisme intracellulaire facultatif. Une des étapes clés de son processus infectieux réside dans l'interaction avec la cellule eucaryote hôte. Cette interaction bactérie-cellule hôte exige de *M. tuberculosis* de posséder à la surface de son enveloppe un ou plusieurs ligand(s) ou adhésine(s) compatible(s) avec le ou les récepteurs de la cellule hôte. Les adhésines ainsi que les récepteurs peuvent être de nature protéique, glucidique ou lipidique ; ils peuvent également être de nature complexe : glycolipide, lipoprotéine etc...

*M. tuberculosis* est capable d'envahir plusieurs types cellulaires, aussi bien des cellules phagocytaires professionnelles que des cellules phagocytaires non professionnelles, entre autre, les cellules épithéliales (Pethe *et al.*, 2001a), les macrophages, les cellules dendritiques (Nigou *et al.*, 2001 ; Tailleux *et al.*, 2003).

### **II.2.1 - Interaction entre mycobactéries et cellules épithéliales (pneumocytes)**

Les cellules épithéliales des alvéoles pulmonaires ou pneumocytes représentent plus de 98 % de l'épithélium pulmonaire contre environ 1 % pour les macrophages alvéolaires (Pethe *et al.*, 2001b). Le tapis de pneumocytes constitue comme toute surface épithéliale, la première barrière de défense face à l'infection. Des études récentes ont révélé le rôle crucial des pneumocytes dans la dissémination de *M. tuberculosis* vers d'autres organes de l'hôte infecté. En effet, lorsque les bacilles de Koch sont inhalés, ceux-ci sont capables d'interagir avec les pneumocytes via une protéine mycobactérienne de surface appelée HBHA (*Heparin-Binding Haemagglutinin Adhesin*) (Menozzi *et al.*, 1996 ; Pethe *et al.*, 2001a).

### **II.2.2 – Interaction entre mycobactéries et macrophages**

Au sein des alvéoles pulmonaires, les mycobactéries sont exposées à l'action des macrophages. *M. tuberculosis* présente des propriétés particulières d'interaction avec certaines adhésines des macrophages. Ces adhésines de surface interagissent soit de manière indirecte, impliquant une opsonisation préalable de *M. tuberculosis* par des fragments C du

complément, soit de manière directe avec les récepteurs présents à la surface de cellules macrophagiques.

*Fragments C du complément et leurs récepteurs.*

Lorsqu'un corps étranger (une particule inerte ou un microorganisme) est détecté par les cellules du système immunitaire inné, la voie alterne du complément est activée, entraînant ainsi la production des fragments C3b et C3bi du complément. Au niveau des poumons, ces composés sont sécrétés par des macrophages alvéolaires ou par des pneumocytes de types II (Chang & Chang, 1986 ; Landay *et al.*, 1983). Les fragments C3b et C3bi peuvent se fixer à la surface de la plupart des corps étrangers et constituer des ligands capables d'interagir de manière spécifique avec les récepteurs du complément (CR) présents à la surface des macrophages, notamment les récepteurs CR1, CR2, CR3 et CR4, qui permettent la phagocytose du corps étranger. Ce mécanisme est mis en place lors d'une infection par *M. tuberculosis* (Schlesinger *et al.*, 1990).

Parallèlement à ce mécanisme relativement passif, les mycobactéries pathogènes sont capables de recruter le fragment C2a du complément pour former une convertase C3 afin de générer un élément C3b opsonisant, ceci en absence d'une activation préalable du complément (Schorey *et al.*, 1997). Dans ces conditions, les mycobactéries opsonisées se fixent principalement au CR1 plutôt qu'au CR3 ou au CR4 (Schorey *et al.*, 1997).

Une étude plus récente a montré que la protéine de surface HBHA de *M. tuberculosis* est capable d'interagir avec le fragment C3 du complément et d'induire à la fois l'adhérence et la phagocytose des bacilles par les macrophages humains (Mueller-Ortiz *et al.*, 2001).

*La protéine du surfactant SP-A (Surfactant Protein A).*

Le surfactant pulmonaire est un complexe multimoléculaire situé à l'interface air-liquide de l'alvéole où il assure de nombreuses fonctions, tant physiques qu'immunitaires et joue également un rôle d'émonctoire. Il est constitué d'une couche lipidique (essentiellement des phospholipides) aux propriétés tensio-actives et d'une phase (ou sous-couche) aqueuse. Des différentes sous-fractions du surfactant, on isole les protéines hydrophobes SP-B et SP-C et les collectines SP-A et SP-D qui ont des propriétés variées. Elles ont notamment des propriétés structurales, métaboliques ou défensives.

La protéine du surfactant SP-A est le composant majeur du surfactant pulmonaire. SP-A est un opsonisant important de la défense innée qui est capable d'induire la phagocytose d'agents pathogènes présents au niveau du surfactant pulmonaire. De récentes études montrent que *M. tuberculosis* est capable d'interagir avec les macrophages alvéolaires murins via la protéine SP-A (Pasula *et al.*, 1997).

*Les récepteurs au mannose (MR).*

Le MR (Mannose Receptor) est une lectine de type C qui médie l'attachement des macrophages aux glycoconjugués exposant des groupements mannosyls, fucosyls et N-acétylglucosamyls. Seuls des macrophages matures produisent à leur surface des MR. La souche *M. tuberculosis* H37Rv est capable de se fixer aux macrophages alvéolaires via le récepteur au mannose et cette fixation semble se faire à travers la reconnaissance de groupements mannosyls du lipoarabinomannane (LAM) mycobactérien (Schlesinger, 1993). Toutefois, étant donné l'inaccessibilité physique des groupements mannosyls du LAM dans l'enveloppe mycobactérienne, il est probable que d'autres composants exposés en surface et riches en mannose tel que l'arabinomannane (AM) capsulaire soient importants pour l'interaction entre les mycobactéries et les macrophages alvéolaires.

*Autres récepteurs.*

CD14, une glycoprotéine membranaire associée à un groupement phosphatidylinositol, est le mieux caractérisé des récepteurs de haute affinité pour les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif. Toutefois, CD14 peut aussi fixer le LAM de *M. tuberculosis* (H37Ra) et cette interaction induit la sécrétion de l'interleukine 8 (IL-8) par les macrophages (Pugin *et al.*, 1994).

Par ailleurs, les récepteurs « scavengers » et les récepteurs Fc $\gamma$  pourraient également permettre l'adhérence des mycobactéries à la surface des macrophages.

Il apparaît donc que l'adhérence des mycobactéries sur les macrophages est médiée par de nombreux récepteurs différents. L'entrée des mycobactéries dans les macrophages et leur capacité ultérieure à survivre ne semblent pas dépendre du type de récepteur utilisé (Hu *et al.*, 2000 ; Zimmerli *et al.*, 1996), mais plutôt de la capacité des mycobactéries à aménager des phagosomes propices à leur multiplication.

**II.2.3 – Mécanismes de persistance des mycobactéries**

La capacité de *M. tuberculosis* à contourner le système de défense de l'hôte est due au fait que ce bacille est apte à survivre dans l'environnement hostile que représente les cellules phagocytaires du système immunitaire inné et du système immunitaire acquis. *M. tuberculosis* est ainsi capable de persister au niveau du site d'infection et de demeurer en dormance pendant plusieurs années. La persistance des bacilles dans les cellules

phagocytaires implique la mise en place de mécanismes de survie qui permettent d'échapper aux moyens développés par les cellules phagocytaires pour détruire les bactéries pathogènes.

*Survie de M. tuberculosis dans le macrophage.*

Les mycobactéries ont développé des mécanismes leur permettant de résister partiellement aux effets délétères du monoxyde d'azote (NO, *nitric oxide*), des radicaux azotés (RNI, *reactive nitrogen intermediates*) et des radicaux oxygénés (ROI, *reactive oxygen intermediates*) produits par les macrophages activés. Certains composés de l'enveloppe mycobactérienne comme le LAM sont capables d'inhiber l'action des ROI en empêchant l'activation des macrophages (Chan *et al.*, 1991). En plus de cette barrière passive, les mycobactéries pathogènes résistent activement à ce stress grâce à la production d'enzymes aptes à transformer les RNI et les ROI en composés moins toxiques. Jusqu'à présent, cinq gènes de *M. tuberculosis* impliqués dans la résistance aux RNI et/ou aux ROI ont été identifiés.

a) La catalase-peroxydase, codée par le gène *katG* de *M. tuberculosis* permet aux bacilles de résister à l'action délétère de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produit par les macrophages activés (Manca *et al.*, 1999). La catalase-peroxydase contribue à la virulence de *M. tuberculosis* dans le modèle cobaye (Li *et al.*, 1998) et souris (Heym *et al.*, 1997), suggérant que les réactifs intermédiaires oxygénés et notamment H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contribuent au contrôle de la tuberculose *in vivo*, et que *M. tuberculosis* a développé une stratégie pour y faire face.

b) Deux superoxydes dismutases (SOD), SodA (Zhang *et al.*, 1991) et SodC (Wu *et al.*, 1998) sont produites par *M. tuberculosis*. SodA est abondamment sécrétée dans le milieu de culture (Harth & Horwitz, 1999), tandis que SodC est présent à la surface de *M. tuberculosis* (Wu *et al.*, 1998). SodA et SodC participent à la résistance de *M. tuberculosis* au stress oxydatif en catalysant la transformation des radicaux O<sub>2</sub><sup>-</sup> en peroxyde d'hydrogène.

c) *M. tuberculosis* produit une alkyl hydroperoxyde réductase C, codée par *ahpC*. AhpC est impliquée dans la résistance à plusieurs composés toxiques, notamment les hydroperoxydes organiques (Heym *et al.*, 1997 ; Springer *et al.*, 2001), les peroxydinitrites (Bryk *et al.*, 2000), ainsi que plusieurs RNI (Chen *et al.*, 1998). La construction de souches déficientes pour l'expression de *ahpC* (Springer, *et al.*, 2001) ou surproduisant AhpC (Heym *et al.*, 1997) a permis d'établir que cette enzyme participe de manière effective à la résistance de *M. tuberculosis* aux hydroperoxydes organiques. L'activité alkyl

hydroperoxyde réductase pourrait être un trait de virulence important de *M. tuberculosis* comme en témoigne l'existence d'un deuxième gène (*ahpD*) présentant la même fonction (Hillas *et al.*, 2000). Il est également possible que ces deux enzymes aient des activités redondantes ou qu'elles agissent de manière synergique.

d) Chez *M. tuberculosis* les produits des gènes *noxR1* et *noxR3* sont impliqués dans la résistance simultanée aux RNI et aux ROI. Les protéines NoxR1 et NoxR3 agissent selon un mécanisme d'action inconnu pour le moment. La surexpression de *noxR1* chez *M. smegmatis* permet une meilleure résistance au stress oxydatif et au stress azoté dans les macrophages activés (Ehrt *et al.*, 1997). Cependant une souche de *M. tuberculosis* déficiente pour la production de NoxR1 se comporte comme la souche parentale dans le modèle murin (Stewart *et al.*, 2000), suggérant que *M. tuberculosis* produit d'autres protéines ayant des activités redondantes avec NoxR1. Le gène *noxR3* est capable de conférer à *Salmonella typhimurium* une résistance accrue aux RNI et aux ROI (Ruan *et al.*, 1999), mais la part de participation de ce gène à la résistance de *M. tuberculosis* aux RNI et aux ROI reste à définir.

e) *M. tuberculosis* produit également une réductase (*peptide methionine sulfoxyde reductase*) dont le rôle est de réparer certains dommages causés par les RNI et les ROI. Cette enzyme permet par exemple de catalyser la réduction des méthionines qui ont été oxydées par l'action des peroxy-nitrites (St John *et al.*, 2001).

### ***II.3 – Réaction de l'hôte face à l'invasion par M. tuberculosis***

L'interaction des bacilles tuberculeux avec les cellules du site d'infection engendre l'activation des processus de l'immunité innée, et plus tardivement de l'immunité adaptative. La mise en place de la défense innée se traduit principalement par l'activation des macrophages alvéolaires, dès lors aptes à détruire les bactéries phagocytées, tandis que l'immunité spécialisée consiste en l'activation des lymphocytes.

#### **II.3.1 – Les ROI, le NO et les RNI**

Les macrophages et les monocytes activés produisent des radicaux oxygénés (ROI), du monoxyde d'azote (NO) et des radicaux azotés (RNI). Les ROI, le NO et les RNI sont de

petites molécules toxiques qui ont un spectre d'action relativement large. Ils sont capables de détruire aussi bien des bactéries que des virus ou des parasites en induisant des mutations dans leurs acides nucléiques (Wink *et al.*, 1991). Ces molécules peuvent également provoquer une oxydation de certains acides aminés tels que la cystéine et la méthionine.

Comme décrit précédemment, le bacille de Koch produit au moins deux enzymes, SodA et SodC qui catalysent la transformation des radicaux oxygénés en molécules moins délétères. Dès lors, les ROI (*reactive oxygen intermediates*) semblent relativement inefficaces pour limiter l'expansion de *M. tuberculosis*.

*Les RNI (reactive nitrogen intermediates)*. Le terme RNI englobe les différents états d'oxydation de produits azotés au départ du monoxyde d'azote (NO). Les macrophages produisent deux enzymes, iNOS (*inducible nitric oxide synthase* ; oxyde nitrique synthase inductible) et NOS2 (*nitric oxide synthase 2* ; oxyde nitrique synthase 2) (Nicholson *et al.*, 1996) capables d'assurer la production du monoxyde d'azote. Les NOS catalysent la réaction de formation de NO à partir de la L-arginine. En effet, sous l'action de l'oxyde nitrique synthase (NOS), la L-arginine est hydrolysée en L-citrulline, en NO et en  $O_2^-$  (Xia & Zweier, 1997a). Le NO va par la suite interagir avec le radical  $O_2^-$  pour former un RNI ( $ONOO^-$  ; peroxydite oxydant) (Xia & Zweier, 1997a).

La production d'iNOS est stimulée par plusieurs cytokines dont l' $IFN\gamma$ , l' $IL-1\beta$ , le  $TNF\alpha$  et l'endotoxine, contribuant ainsi à la défense de l'hôte contre des infections bactériennes, virales et parasitaires (Barnes & Belvisi, 1993). Des expériences menées par Chan et ses collègues ont montré que le NO et les RNI ont une activité bactéricide, y compris contre les mycobactéries (Chan *et al.*, 1992).

Lors de la mise en place de la défense innée, les RNI jouent un rôle important dans l'arrêt de la progression de la tuberculose. Ainsi, chez la souris, la déficience de production de NOS2 ou l'inhibition de cette enzyme conduit à une évolution rapide de la maladie vers une phase clinique terminale (MacMicking *et al.*, 1997b). Cette susceptibilité accrue à l'infection est due à l'incapacité de ces souris à contrôler la prolifération bactérienne, et ceci malgré une production normale d' $IFN\gamma$  et de  $TNF\alpha$ . Chez l'homme, les macrophages isolés de poumons de patients infectés par *M. tuberculosis* produisent de forts taux de NOS, et la production de RNI qui en découle est capable de tuer des mycobactéries (Nozaki *et al.*, 1997). Par contre, l'ajout d'un inhibiteur de la NOS rend ces macrophages permissifs à l'infection par *M. tuberculosis*, soulignant l'importance des RNI dans la réponse innée antituberculeuse.

### II.3.2 – Immunité cellulaire médiée par les lymphocytes T

L'élimination de l'infection à *M. tuberculosis* dépend principalement du succès de l'interaction entre les macrophages et les lymphocytes T. Après une activation préalable par des antigènes mycobactériens, les cellules T CD4<sup>+</sup> produisent des cytokines telles que l'INF $\gamma$  et le TNF $\alpha$ . Les CD8<sup>+</sup> contribuent également au contrôle de l'infection en sécrétant des cytokines qui vont induire l'apoptose des cellules infectées par *M. tuberculosis* (Geluk *et al.*, 2000 ; Stenger *et al.*, 1998). L'immunité cellulaire joue un rôle très important dans le contrôle de la tuberculose, comme l'illustre l'influence dramatique d'immunodéficience primaire ou acquise sur le développement de la maladie.

### II.3.3 – Le granulome

A un stade avancé de l'infection par *M. tuberculosis*, les poumons développent des nodules caractéristiques appelés granulomes ou tubercules. Les macrophages infectés par des mycobactéries sécrètent des chémokines chimioattractantes qui ont un rôle crucial dans le recrutement des monocytes, des lymphocytes T et des cellules dendritiques sur le lieu de l'infection. Les cellules ainsi recrutées entourent progressivement les macrophages infectés tout en se différenciant afin de détruire les mycobactéries contenues dans le granulome formé et de circonscrire l'infection. Dans le granulome, les macrophages occupent les strates les plus internes tandis que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> se trouvent en périphérie, le tout étant couvert par du tissu conjonctif. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en revanche sont pris en sandwich entre les macrophages et les cellules CD8<sup>+</sup> (Gonzalez-Juarrero *et al.*, 2001).

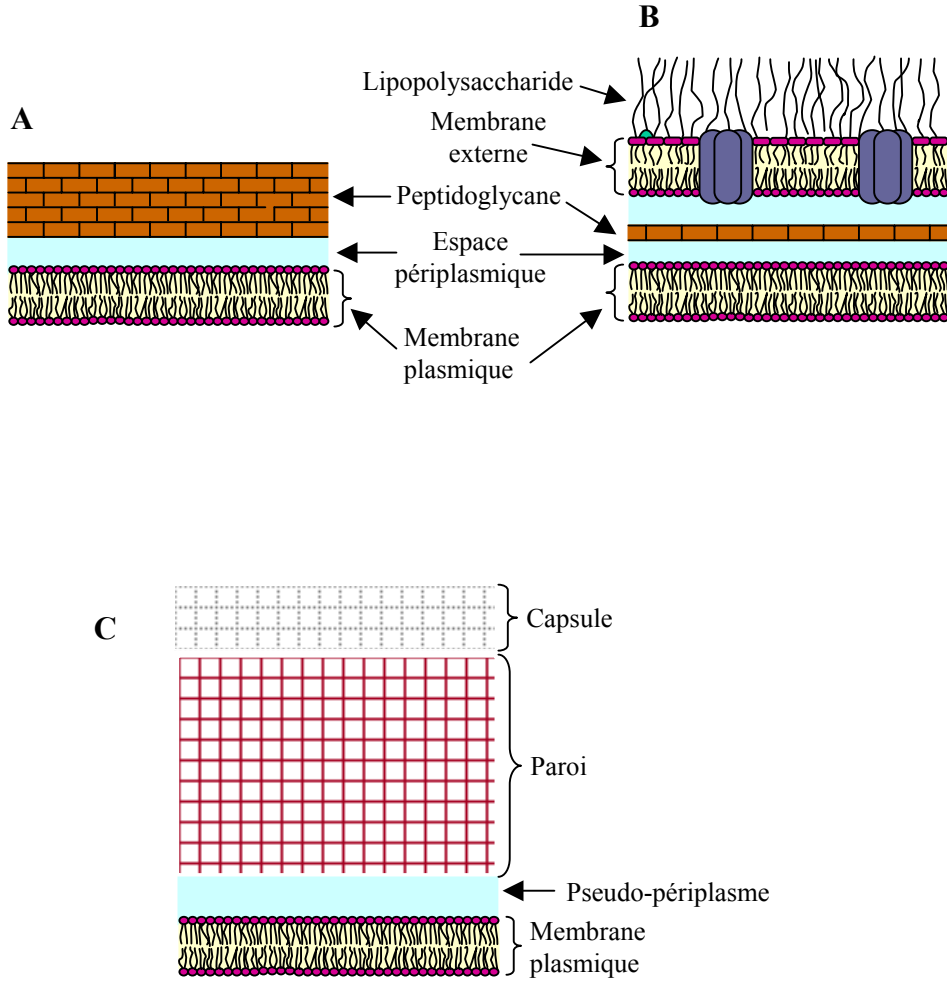
Des études réalisées chez des souris incapables de produire du TNF $\alpha$  ont permis de mettre en évidence l'importance des granulomes dans le processus de défense contre l'infection par *M. tuberculosis* (Bean *et al.*, 1999). Malgré une production d'INF $\gamma$  et de NOS comparable à celle des souris contrôles, les souris incapables de produire du TNF $\alpha$  sont très susceptibles à une infection par *M. tuberculosis*. Cette susceptibilité accrue semble être due à une perte de capacité à former des granulomes (Bean, *et al.*, 1999).

Les granulomes sont donc essentiels pour contrôler des infections mycobactériennes pulmonaires. Les granulomes pourraient aussi contenir quelques mycobactéries vivantes en état de dormance et réactivables en cas de déficit immunitaire de l'hôte infecté.

*M. tuberculosis* est capable de survivre dans cet environnement hostile très pauvre en oxygène en utilisant le nitrate comme source d'énergie (Weber *et al.*, 2000) ou encore grâce à l'utilisation des acides gras de l'hôte comme source de carbone (McKinney *et al.*, 2000).



### **III - L'ENVELOPPE CELLULAIRE DE *M. tuberculosis***



**Figure 3** : représentation schématique d'enveloppes bactériennes. A, enveloppe d'une bactérie à Gram positif ; B, enveloppe d'une bactérie à Gram négatif ; C, enveloppe mycobactérienne.

### III - L'enveloppe cellulaire de *M. tuberculosis*

L'enveloppe cellulaire est pour plusieurs raisons une des parties les plus importantes de la cellule, tant pour la cellule procaryote que pour la cellule eucaryote. Elle régit la forme des cellules, leur procure leur résistance mécanique et les protège de certaines substances toxiques. En outre, l'enveloppe cellulaire de nombreux agents infectieux possède des constituants qui contribuent au pouvoir pathogène. Enfin, elle va jouer un rôle prépondérant dans l'interaction avec l'hôte. L'importance de cette structure en fait ainsi un site d'action privilégié de plusieurs antibiotiques.

Sur la base d'une coloration développée par Christian Gram en 1884, les bactéries se divisent en deux groupes majeurs : les Gram positifs et les Gram négatifs. Ce n'est que bien plus tard, essentiellement suite à la découverte de la microscopie électronique, que cette différence de comportement à la coloration entre ces deux groupes a été reliée aux différences d'architecture de l'enveloppe.

L'enveloppe des bactéries à Gram positif est formée d'une seule couche épaisse et homogène de peptidoglycane ou muréine qui se trouve à l'extérieur de la membrane plasmique (figure 3A). Par contre, l'enveloppe des bactéries à Gram négatif est un peu plus complexe. Elle contient une couche de peptidoglycane de moindre épaisseur entourée d'une membrane externe (figure 3B). Dans certains cas, tant chez les bactéries à Gram positif que chez les bactéries à Gram négatif, il existe une structure capsulaire qui recouvre la bactérie.

Les mycobactéries sont des bactéries à Gram positif présentant cependant une architecture et une composition d'enveloppe relativement différentes des autres firmicutes. En effet, l'enveloppe mycobactérienne est composée de trois éléments structuraux : une *capsule*, une *paroi* extrêmement complexe délimitant avec la *membrane plasmique* un espace pour certains aspects comparable à un espace périplasmique (Daffe & Draper, 1998) (figure 3C). L'enveloppe cellulaire des mycobactéries constitue un véritable rempart contre certaines agressions extérieures pouvant mettre en péril l'intégrité de la cellule. Elle constitue aussi une barrière pour l'entrée de certains antibiotiques. En effet, il a été montré que l'efficacité de certains antibiotiques sur les mycobactéries augmente lorsqu'on ajoute du détergent tel que le Tween 80 dans le milieu de culture (Mizuguchi *et al.*, 1983), ou lorsque la structure de l'enveloppe est perturbée suite à des mutations (David *et al.*, 1987). Chez les mycobactéries, l'enveloppe joue un rôle déterminant dans l'interaction avec l'hôte et

participe à la pathogenèse (Daffe & Draper, 1998). De ce fait, certains constituants de l'enveloppe tels que les protéines de surface et les lipopolysaccharides représentent de bons candidats vaccinaux. Ainsi, le caractère déterminant de l'enveloppe mycobactérienne dans la pathogenèse du bacille de Koch rend nécessaire d'une part, la compréhension de la structure de cette enveloppe et d'autre part celle de la biosynthèse des éléments constituant cette enveloppe. Certaines des enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces éléments peuvent constituer des cibles privilégiées d'agents antimycobactériens.

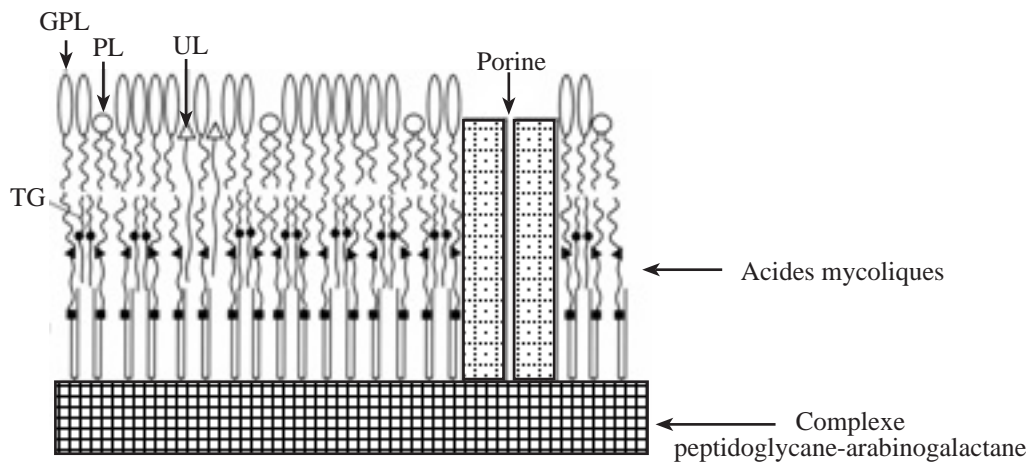
Dans ce chapitre, nous allons nous attarder particulièrement sur la paroi, cible de puissants antituberculeux.

### ***III.1 – La membrane plasmique et le pseudo-périplasme***

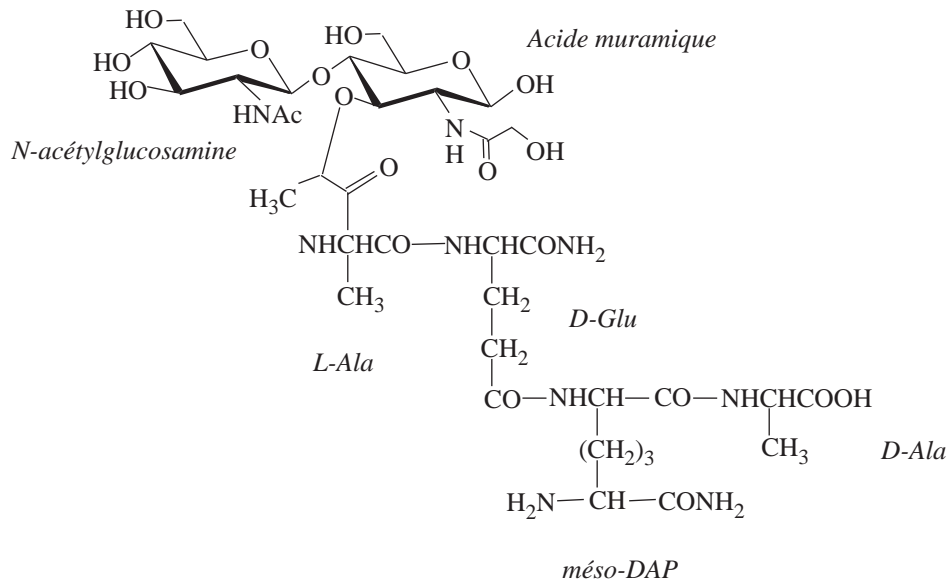
La membrane plasmique mycobactérienne présente une composition classique de lipides polaires, principalement des phospholipides, et des protéines adsorbées à la bicouche lipidique ou traversant la membrane plasmique de part en part.

Le palmitate (C<sub>16:0</sub>), l'acide oléique (*cis*-9-octadecenoate) et le 10-méthyl-octadecenoate (ou acide tuberculostéarique, C<sub>19</sub>) sont les acides gras majeurs de la bicouche lipidique des mycobactéries. Le phosphatidylinositol mannoside (PIM), le lipoarabinomannane (LAM) et le lipomannane (LM) sont des lipides sucrés relativement spécifiques des mycobactéries. Le LAM est un lipopolysaccharide hétérogène impliqué dans l'interaction de *M. tuberculosis* avec les macrophages, dans l'internalisation du bacille ainsi que dans l'atténuation de la réponse immunitaire de l'hôte (Kremer *et al.*, 1999).

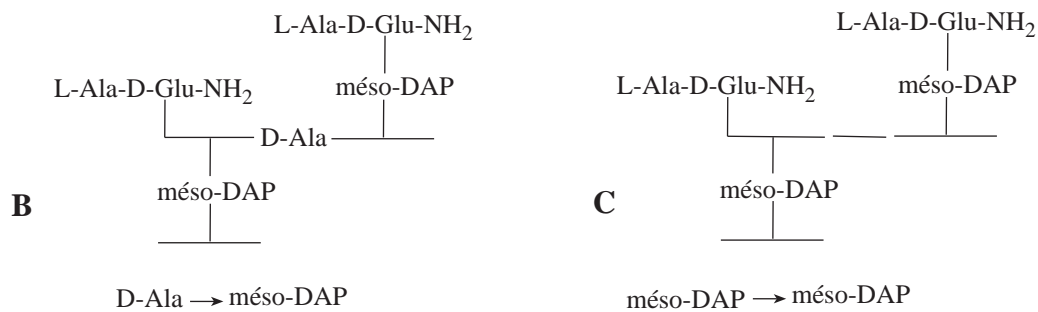
L'existence chez les mycobactéries d'une structure dont l'analogie fonctionnelle rappelle celle d'un périplasme est suggérée par la toxicité induite par le gène *sacB* en présence de saccharose. En effet, ce gène isolé de *Bacillus subtilis* code la lévansucrase, une enzyme qui hydrolyse le saccharose et catalyse la synthèse de lévanes, un polymère de fructose à haut poids moléculaire qui s'accumule dans l'espace périplasmique (Dedonder, 1966). L'expression de *sacB* est induite en présence de saccharose et provoque la mort des mycobactéries suite à l'accumulation des lévanes (Pelicic *et al.*, 1996a). Cette propriété de SacB a été exploitée comme outil dans la sélection de recombinaisons homologues chez les mycobactéries (Pelicic *et al.*, 1996b). Le pseudo-périplasme des mycobactéries abrite



**Figure 4** : Paroi mycobactérienne, modèle de *M. chelonae* (d'après Daffé et Draper., 1998). Les lipides associés aux acides mycoliques ont été représenté GPL, glycopeptidolipide PL, glycophospholipide ; UL, lipide de structure inconnue ; TG, triglycéride.



**Figure 5 A** : Monomère de peptidoglycane.



**Figure 5 B et C** : Les deux types de liaisons interpeptidiques du peptidoglycane des mycobactéries.

également des protéines diverses parmi lesquelles la protéine OmpATb qui forme des pores dans la paroi mycobactérienne (Raynaud *et al.*, 2002 ; Senaratne *et al.*, 1998).

### ***III.2 – La paroi mycobactérienne***

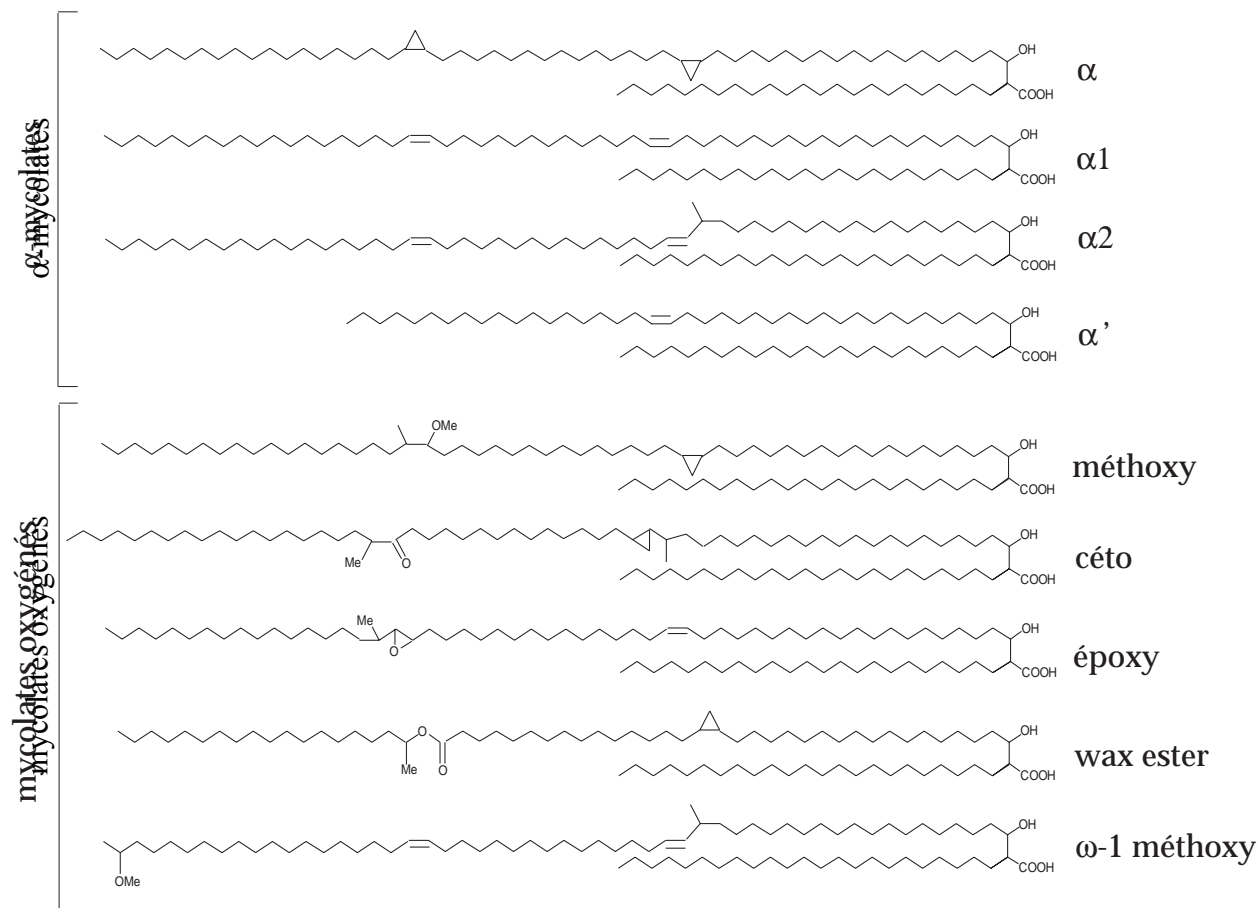
La paroi mycobactérienne présente une architecture caractéristique et particulièrement complexe. Le squelette de la paroi est composé de trois éléments associés de manière covalente : *le peptidoglycane*, *l'arabinogalactane* et *les acides mycoliques* (figure 4). Dans cet enchevêtrement de molécules complexes s'intercale le lipoarabinomannane de manière non covalente.

#### *Le peptidoglycane.*

Le peptidoglycane des mycobactéries est constitué de disaccharides (N-acétylglycosamine  $\beta(1\rightarrow4)$  acide N-glycolylmuramique) et de tétrapeptides : L-alanine, D-isoglutamine, acide méso-diaminopimélique (méso-DAP) et D-alanine (figure 5A) (Petit & Lederer, 1984). Les unités de peptidoglycane sont reliées par des jonctions D-ala-méso-DAP et par des jonctions méso-DAP-méso-DAP, indiquant qu'il y aurait au moins deux types de transpeptidases présentes chez les mycobactéries (figure 5B et 5C). Cette information est intéressante sur le plan clinique et explique pourquoi les mycobactéries sont naturellement résistantes aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames dont les cibles sont des transpeptidases.

#### *L'arabinogalactane.*

L'arabinogalactane (AG) est un polysaccharide composé de trois chaînes latérales d'arabinane qui comptent environ 27 résidus D-arabinofuranosyl chacune, attachées à une chaîne axiale d'homogalactane constituée d'environ 32 résidus galactofuranosyl (Daffe & Draper, 1998). La partie terminale de l'AG est associée au peptidoglycane grâce à une liaison phosphodiester entre le résidu N-acétylglucosamine (GlcNac) et le muramyl-6-phosphate (McNeil *et al.*, 1990). L'éthambutol, un antituberculeux de première intention inhibe la synthèse de l'AG (Takayama & Kilburn, 1989) en interférant avec la synthèse des segments d'arabinanes et de galactanes (Deng *et al.*, 1995), provoquant ainsi l'inhibition du transfert des acides mycoliques sur la paroi, faute de nouveaux sites d'attachement des résidus mycolates sur les segments d'arabinanes.



**Figure 6** : Structure des acides mycoliques de type  $\alpha$  et de type oxygéné.

*Les acides mycoliques.*

Ces lipides de la paroi mycobactérienne constituent une enveloppe cireuse faisant office de pseudo-membrane externe. La couche d'acides mycoliques est très peu perméable aux composés hydrophiles et en particulier à bon nombre d'antibiotiques. Beaucoup d'antituberculeux puissants dont l'isoniazide, l'éthionamide, l'isoxyl et la thiolactomycine inhibent la synthèse des acides mycoliques (Larsen *et al.*, 2002 ; Miesel *et al.*, 1998b ; Schroeder *et al.*, 2002).

Les acides mycoliques sont de longues chaînes d'acides gras (de 60 à 90 atomes de carbone) ramifiées en position alpha et hydroxylées en position bêta. Cette structure de base dépourvue de fonction oxygénée est appelée  $\alpha$ -mycolate (C<sub>90</sub>) ou  $\alpha'$ -mycolate pour les plus courtes (C<sub>60</sub>). Des formes oxygénées de ces structures de base comme les céto-, époxy-, méthoxy-, et carboxy-mycolates ou des esters de mycolates ont été caractérisées chez diverses espèces mycobactériennes (figure 6).

**III.3 – La capsule**

L'existence d'une capsule chez les mycobactéries fut évoquée pour la première fois en 1959 par Chapman et son équipe. Mais la technique de fixation chimique utilisée pour la mise en évidence de la capsule a été maintes fois décriée. Cependant, Paul et Beveridge ont confirmé l'existence de cette capsule mycobactérienne grâce à la technique de fixation à froid-substitution et par des photos de microscopie électronique. La structure capsulaire ne semble être présente que chez les mycobactéries prélevées de cultures statiques ou extraites de cellules phagocytaires, alors que cette structure est absente chez les mycobactéries cultivées sous agitation, celle-ci étant relarguée dans le milieu de culture par rupture mécanique (Daffe & Draper, 1998). Il est possible que dans les conditions naturelles, aussi bien dans l'eau, dans le sol que dans la cellule hôte infectée, la capsule reste présente à la surface des mycobactéries (Daffe & Draper, 1998).

La capsule est constituée de polysaccharides, de protéines et de petits lipides (Daffe & Etienne, 1999 ; Ortalo-Magne *et al.*, 1996a ; Ortalo-Magne *et al.*, 1995). L'existence de porines codées par le gène *ompA* laisse présumer que la capsule mycobactérienne est une structure suffisamment lâche pour permettre la diffusion des molécules qui transitent par ces porines.



*Les polysaccharides.*

Les polysaccharides sont principalement constitués de glucanes, d'arabino-mannanes (AM) et de mannanes. On note également dans la capsule la présence d'oligo- et de poly-saccharides non caractérisés à l'heure actuelle (Daffe & Etienne, 1999). Le glucane est une molécule composée de cinq à six résidus glycosyls dérivés du glycogène intracellulaire des bacilles (Daffe & Etienne, 1999).

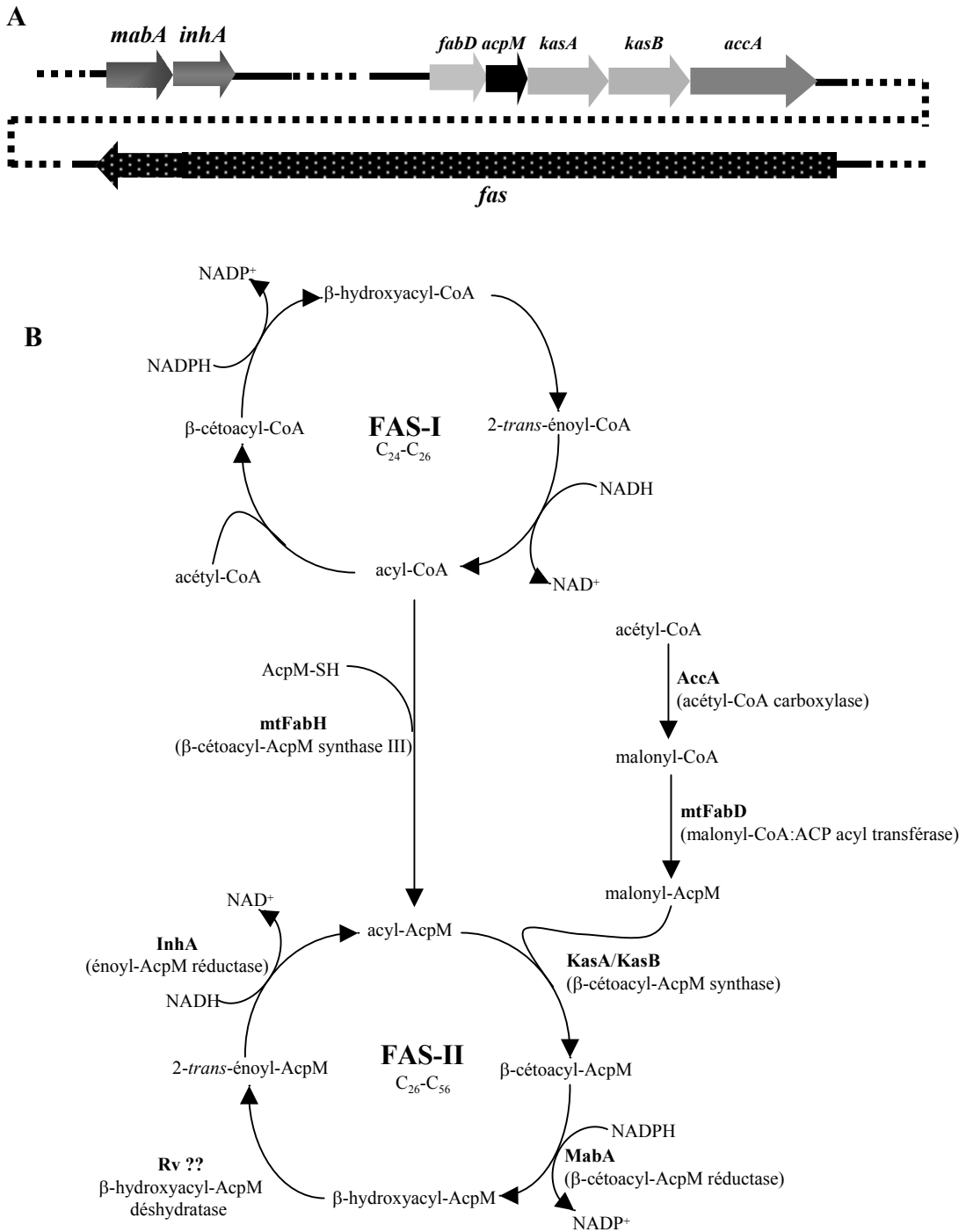
L'hétéropolysaccharide, D-arabino-D-mannane (AM) est composé de résidus arabinosyls et de résidus mannosyls. Cette structure est très apparentée au LAM de *M. tuberculosis* décrit par Brennan et son équipe (Chatterjee *et al.*, 1992). Il semblerait d'ailleurs que le LAM associé au feuillet externe de la membrane plasmique de *M. tuberculosis* soit le précurseur de l'AM, puisque ces deux molécules ne diffèrent que par la partie lipidique. De plus, le LAM et l'AM ont des fonctions communes dans la pathogenèse de *M. tuberculosis*. Ainsi, LAM et AM partagent le même récepteur au mannose (MR, *Mannose Receptor*) dans l'interaction de *M. tuberculosis* avec les macrophages (Ortalo-Magne *et al.*, 1996a ; Schlesinger *et al.*, 1994 ; Schlesinger *et al.*, 1996).

*Les protéines capsulaires.*

De récentes études évaluent à plus de 200 le nombre de polypeptides associés à la capsule (Sonnenberg, 1997). Cette fraction regroupe aussi bien des protéines sécrétées, comme par exemple les antigènes du complexe 85, mais aussi de nombreuses protéines dépourvues de séquence d'exportation telles que la superoxyde dismutase, l'alanine déshydrogénase, la glutamine synthase, l'alcool déshydrogénase et la thiorédoxine. Cette observation laisse envisager l'hypothèse que *M. tuberculosis* soit capable d'exporter des protéines selon un mécanisme indépendant de la voie classique de sécrétion (Harth & Horwitz, 1999).

*Les lipides capsulaires.*

Il a été longtemps considéré que les mycobactéries étaient entourées par une épaisse couche lipidique cireuse. Le fait que la capsule mycobactérienne soit principalement constituée de protéines et de carbohydrates a donc révolutionné cette idée. L'examen attentif de la capsule révèle cependant de petits lipides particulièrement abondants sur la face interne tels que des glycolipides phénoliques (PGL), des glycopeptidolipides (GPL) et du tréhalose dimycolate (TDM) (Ortalo-Magne *et al.*, 1996b).



**Figure 7** : A, organisation structurale des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides mycoliques chez *M. tuberculosis*. B, Schéma de biosynthèse de la chaîne courte et de la chaîne de méromycolate.

Si la capsule mycobactérienne ne contient aucune cible connue d'antituberculeux, cette structure constitue cependant un important réservoir de cibles vaccinales potentielles.

### ***III.4 – Biosynthèse des acides mycoliques***

La biosynthèse des acides mycoliques est un processus discontinu au cours de la croissance mycobactérienne. En effet, la synthèse des acides mycoliques n'a lieu que pendant la phase de division cellulaire (Lacave *et al.*, 1989). La biosynthèse des acides mycoliques se déroule en 5 phases (Takayama & Qureshi, 1984) :

(1) synthèse de la chaîne linéaire d'acide gras saturée avec un nombre d'atomes de carbone variant entre 24 et 26. Les acides gras saturés vont constituer la chaîne  $\alpha$ -alkyle et servir également de précurseurs pour la synthèse du méromycolate dont la longueur varie de C<sub>26</sub> à C<sub>56</sub> selon les espèces ;

(2) synthèse de la chaîne d'acide méromycolique par élongation de la chaîne d'acide gras linéaire citée ci-dessus ;

(3) modification de la chaîne d'acide méromycolique par l'introduction de groupements fonctionnels ;

(4) condensation de type Claisen entre la chaîne de méromycolate et la chaîne  $\alpha$ , suivie d'une réaction de réduction du déshydromycolate en mycolate ;

(5) transfert par les mycolyltransférases du complexe d'antigènes 85 des molécules d'acides mycoliques néosynthétisées vers différents transporteurs ou accepteurs pour former le glucose monomycolate, le tréhalose monomycolate, le tréhalose dimycolate ou le glycophospholipide mycolate (Myc-PL) (Belisle *et al.*, 1997).

La biosynthèse des acides mycoliques est suivie d'une réaction d'estérification des mycolates sur l'arabinogalactane qui est l'accepteur final de ces molécules.

#### **III.4.1 – Synthèse de la chaîne courte d'acide gras : chaîne $\alpha$ et amorces de la chaîne de méromycolate**

L'élongation des acides gras résulte de cycles successifs de réactions de condensation, de  $\beta$ -céto-réduction, de déshydratation et de réduction de l'énole en croissance. Il existe deux systèmes enzymatiques décrits permettant la synthèse des acides

gras. Le système FAS-I, généralement représentatif des organismes eucaryotes à l'exception des plantes, est un complexe enzymatique multifonctionnel rassemblant toutes les activités enzymatiques utiles à la synthèse des acides gras. A l'opposé, le système FAS-II est constitué de plusieurs enzymes distinctes qui catalysent chacune une réaction du cycle de synthèse. FAS-II est la machinerie type des bactéries et des plantes.

Fonctionnellement, les systèmes FAS-I et FAS-II présentent un bon nombre de points communs. Le substrat est préalablement activé par transfert sur le groupement prosthétique de la protéine porteuse d'acyle (ACP, *acyl carrier protein*) ou sur le coenzyme A (CoA). La condensation de la chaîne d'acide gras en croissance avec une molécule de malonate conduisant à un  $\beta$ -cétoacyle constitue la première étape de l'élongation de l'acide gras. Cette étape est catalysée par une cétoacyl synthase des systèmes FAS. La réduction du  $\beta$ -cétoacyle catalysée par une cétoacyl réductase conduit à la production d'un alcool secondaire qui à son tour est déshydraté en un énoyl-ACP [ $\alpha,\beta$ ]-insaturé (*trans*- $\Delta^2$ -énoyl-ACP) grâce à une  $\beta$ -hydroxyacyle déshydratase. Le cycle d'élongation de l'acide gras se conclue par la réduction du *trans*- $\Delta^2$ -énoyl-ACP par une énoyle réductase.

Contrairement à la plupart des organismes, les mycobactéries possèdent à la fois un système FAS-I et un système FAS-II. Le système FAS-I de *M. bovis* BCG consiste en une protéine multifonctionnelle de 301 kDa (Fernandes & Kolattukudy, 1996) qui catalyse à la fois la synthèse *de novo* des acides gras de C<sub>16</sub>-C<sub>18</sub> et l'élongation de la chaîne d'acide gras jusqu'à 26 atomes de carbone (Schroeder, *et al.*, 2002). L'analyse par homologie révèle que cette protéine est organisée en domaines fonctionnels possédant respectivement les activités putatives suivantes : acyl-transférase, énoyl-réductase, déshydratase, malonyl/palmitoyl-transférase, protéine porteuse d'acyle,  $\beta$ -céto-réductase et  $\beta$ -cétoacyle-synthase.

#### III.4.2 – Le système FAS-II et la synthèse de la chaîne $\beta$ (méromycolate)

Le système FAS-II mycobactérien se différencie des systèmes classiques par sa spécificité d'amorce. Celui-ci ne permet pas une synthèse *de novo* des acides gras, mais est en revanche capable d'assurer l'extension du palmitoyl-CoA par l'ajout de molécules de malonyl-CoA (figure 7B), permettant ainsi l'élongation de la chaîne carbonée dont la taille varie de C<sub>24</sub> à C<sub>56</sub> (Mdluli *et al.*, 1998). Le séquençage complet du génome de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998) a permis de dégager l'organisation structurale des gènes du système FAS-II (figure 7A). Le principal locus est un opéron de 5 gènes. Le

premier gène de cet opéron, *fabD* (*Rv2243*) code une malonyl-CoA:ACP acyl-transférase, le second gène (*acpM*, *Rv2244*) code une ACP mycobactérienne (AcpM) qui transporte la chaîne d'acyle en croissance d'un centre de réaction d'une enzyme à un autre. Les gènes *kasA* (*Rv2245*) et *kasB* (*Rv2246*), respectivement troisième et quatrième gènes de l'opéron, codent des  $\beta$ -cétosynthases. Chez *E. coli*, les  $\beta$ -cétosynthases contrôlent la réaction d'élongation de l'acide gras en croissance par condensation d'un groupement acyl-ACP ou acyl-CoA avec du malonylCoA (Edwards *et al.*, 1997 ; Magnuson *et al.*, 1993). Parallèlement, l'enzyme mycobactérienne KasA permet l'élongation d'une chaîne de palmitoyl-ACP (Kremer *et al.*, 2002). Le dernier gène de l'opéron, *accA* (*Rv2247*) code une enzyme qui catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA pour générer du malonyl-CoA, substrat du système FAS II.

Deux autres gènes, dont les produits sont également requis pour compléter le cycle de synthèse des acides gras, sont localisés sur un autre opéron (figure 7A). Ces deux gènes, *inhA* et *mabA*, codent respectivement une énoyl-réductase et une cétoréductase. Des mutations ponctuelles dans la région 5' de cet opéron conduisent à des mycobactéries résistantes à la fois à l'isoniazide et à l'éthionamide (Banerjee *et al.*, 1994). La déshydratase nécessaire pour la biosynthèse des acides gras reste à ce jour inconnue.

L'inactivation du gène *inhA* codant l'énoyl-ACP réductase du système FAS-II conduit à une accumulation des produits finaux de FAS-I ( $C_{24:0}$ ) et à la lyse cellulaire chez *M. smegmatis* (Vilcheze *et al.*, 2000), montrant que le rôle du système FAS-II est avant tout l'élongation des acides gras en acides mycoliques. L'enzyme mycobactérienne mtFabH ( $\beta$ -cétosynthase III) jouerait un rôle charnière entre le système FAS-I et le système FAS-II (Choi *et al.*, 2000) en catalysant la conversion de l'acyl-CoA, issu de FAS-I, en acyl-AcpM, substrat de KasA et KasB.

### **III.4.3 – Modification de la chaîne de méromycolate et la condensation de type Claisen**

Après ou parallèlement à sa synthèse, la chaîne de méromycolate subit une désaturation distale et une désaturation proximale. Le méromycolate désaturé pourra ensuite constituer le substrat d'une réaction de cyclopropanation en position proximale et/ou de méthylation/oxydation.

Après la synthèse de la chaîne  $\alpha$  et de la chaîne de méromycolate modifiée sous différentes formes selon les espèces mycobactériennes, il s'en suit une étape de condensation de type Claisen des deux chaînes néosynthétisées. Les données se rapportant à l'étape de la condensation des deux chaînes restent encore fragmentaires. Toutefois, la réaction de condensation de type Claisen impliquerait une interaction entre un méromycolate- $C_{56}$  activé (méromycolate- $C_{56}$ -AcpM) et un acide gras  $C_{26}$  activé (acide gras  $C_{26}$ -AcpM) pour générer un intermédiaire 3-oxo qui serait ensuite réduit pour former la molécule d'acide mycolique « mature » (Minnikin, 1982 ; Takayama & Davidson, 1979a,b ; Lee, 1997).

#### III.4.4 – Le complexe Antigène 85 et l'activité mycolyltransférase

Probablement dans l'attente d'être transférés sur les arabinogalactanes, accepteurs définitifs de la paroi mycobactérienne, les acides mycoliques néosynthétisés sont préalablement transférés sur du glucose, du tréhalose et des phospholipides. Ces molécules vont assurer le transport des acides mycoliques vers leur destination finale. Les acides mycoliques sont ainsi fournis aux enzymes de synthèse de la paroi sous forme de glucose monomycolate, mycolyl-phospholipide, tréhalose monomycolate (TMM) et tréhalose dimycolate (TDM). Chez *M. tuberculosis*, le complexe Antigène 85 catalyse la réaction de transfert de groupements mycolyles sur du tréhalose (Belisle *et al.*, 1997).

## **IV – LUTTE CONTRE LA TUBERCULOSE**

## **IV – Lutte contre la tuberculose**

Depuis des temps immémoriaux, la tuberculose est reconnue comme une maladie de la pauvreté, et l'accroissement de l'infection conjointe par *M. tuberculosis* et le VIH contribue fortement à la perpétuation de cette maladie. Ainsi, la pauvreté entretient un niveau insuffisant d'hygiène et une limitation des moyens de prévention par l'éducation. Réciproquement la maladie plonge des populations dans un état de santé qui anéantit tout effort socio-économique. La réduction de l'expansion de la tuberculose dans certains pays est grandement attribuable à l'amélioration du niveau de vie. En outre, certaines stratégies plus ou moins effectives dans le contrôle de l'infection par *M. tuberculosis* viennent du progrès de la biologie médicale et de la chimiothérapie.

Dans le présent chapitre, nous allons traiter de la prévention de la tuberculose et du traitement de cette maladie.

### ***IV.1 – Vaccination contre la tuberculose***

#### **IV.1.1 – Le vaccin *M. bovis* BCG**

Actuellement, l'unique vaccin utilisé dans la prévention contre la tuberculose est le bacille de Calmette et Guérin (BCG). Le BCG est un vaccin vivant atténué qui dérive d'une souche de *Mycobacterium bovis* virulente pour le bétail. Cette souche a été isolée en 1921 par Albert Calmette et Camille Guérin à l'Institut Pasteur de Lille. Ces deux chercheurs français ont réalisé des cultures successives de *Mycobacterium bovis* sur un milieu de culture artificiel contenant des tranches de pommes de terre mélangées à de la bile de bœuf et du glycérol, et ce jusqu'à obtention d'une souche fortement atténuée.

Depuis sa découverte en 1921, le BCG a été inoculé à des milliards de personnes à travers la planète, ce qui en fait le vaccin le plus administré dans le monde. Cependant, la vaccination par le BCG est depuis de nombreuses années controversée dans beaucoup de pays tels que les Etats-Unis, la Belgique ou l'Inde. Cette controverse est alimentée par deux principales raisons :



*Premièrement*, l'efficacité variable du BCG.

Alors que l'efficacité du BCG a été clairement documentée à certains endroits du globe, sa capacité à protéger les individus contre la tuberculose n'est que très partielle, voire totalement inopérante dans certains pays. Différentes méta-analyses indiquent que l'efficacité de *M. bovis* BCG à protéger contre les formes pulmonaires de la tuberculose varierait entre 0 et 80 % (Colditz *et al.*, 1994). Ainsi, si l'efficacité du BCG semble bonne dans des pays de faible endémie de tuberculose et où les infections par les mycobactéries non-tuberculeuses sont rares, son efficacité est contestable dans les pays de forte endémie de tuberculose et où les infections par les mycobactéries non-tuberculeuses sont fréquentes (Brandt *et al.*, 2002). Ces données ont pu récemment être corrélées aux résultats obtenus dans un modèle murin où les mycobactéries de l'environnement se montrent capables d'empêcher la multiplication de la souche vaccinale *M. bovis* BCG, provoquant ainsi un étiolement rapide de la réponse immunitaire après vaccination par le BCG. Des analyses de génomique comparative indiquent en outre que la souche de *M. bovis* BCG isolée à l'Institut Pasteur de Lille et distribuée à partir de 1921 a évolué (Behr, 2002), certainement à cause des conditions de conservation et de culture variables d'un laboratoire à l'autre. Cette évolution génétique de la souche peut aussi être à l'origine de la disparité de l'efficacité des différents vaccins *M. bovis* BCG.

Par ailleurs, la génomique comparative a permis d'établir que certaines régions chromosomiques présentes chez *M. tuberculosis* H37Rv sont absentes dans la souche vaccinale BCG Pasteur (Brosch *et al.*, 2001 ; Gordon *et al.*, 2001). Ces délétions pourraient être un facteur supplémentaire pour expliquer l'échec partiel de *M. bovis* BCG et laissent envisager qu'une souche atténuée de *M. tuberculosis* serait un meilleur candidat vaccinal pour lutter contre la tuberculose.

*Deuxièmement*, les individus vaccinés par le BCG présentent une réaction positive au test cutané de la tuberculine, rendant donc impossible la distinction par ce test, entre individus vaccinés et individus infectés par *M. tuberculosis*. Pour cette raison, certains pays ont arrêté la vaccination systématique de leur population, préférant le suivi et/ou le traitement des personnes présentant un test tuberculinique positif.

Par contre, le BCG reste actuellement très utile pour prévenir les formes encéphaliques graves de la tuberculose chez les jeunes enfants.

#### IV.1.2 – Développement de nouveaux vaccins

##### *Souches de BCG améliorées.*

Le constat d'échec partiel de *M. bovis* BCG comme agent vaccinal contre différentes formes de tuberculose a amené plusieurs équipes à axer leur programme de recherche sur l'amélioration de la forme actuelle de *M. bovis* BCG. Pour ce faire, des souches de BCG recombinantes ont été construites. Ces recombinants de BCG expriment des facteurs stimulateurs du système immunitaire tels que des protéines formant des pores, des cytokines et des antigènes de *M. tuberculosis* comme l'antigène 85B.

Ainsi, une étude a montré que des souches recombinantes de *M. bovis* BCG (r-BCG) exprimant la listériolysine (Hly) possèdent une plus grande capacité à stimuler les cellules T CD8<sup>+</sup> que la souche parentale (Hess, 1998). Sachant que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> jouent un rôle majeur dans la protection contre la tuberculose, un tel recombinant BCG exprimant la Hly serait un bon candidat vaccinal.

De récents travaux ont montré qu'une souche recombinante de *M. bovis* BCG exprimant l'IL-18 induit une réponse Th1 plus forte que celle provoquée par la souche BCG parentale dans les splénocytes de souris (Biet *et al.*, 2002). Par ailleurs, des souches de *M. bovis* BCG produisant l'IL-2, l'IFN $\gamma$  ou encore le facteur de croissance des macrophages et des polynucléaires provoquent une réponse mémoire dirigée contre des antigènes mycobactériens plus forte que la réponse mémoire induite par un BCG qui ne produit pas ces cytokines (Murray *et al.*, 1996).

Récemment, un *M. bovis* BCG recombinant surproduisant l'antigène 85B de *M. tuberculosis* a été construit. Le BCG recombinant confère une meilleure protection que le BCG parental (Horwitz *et al.*, 2000). De plus, après vaccination, des expériences de compétition avec une souche *M. tuberculosis*, montrent que les animaux vaccinés avec ce BCG recombinant présentent beaucoup moins de lésions dans les poumons, le foie et la rate que les animaux vaccinés avec la souche BCG parentale (Horwitz, *et al.*, 2000). Toutefois, si ces études suggèrent que la modification génétique du BCG est une voie prometteuse pour améliorer la vaccination contre la tuberculose, le pouvoir protecteur de ces souches recombinantes reste à être évalué chez l'homme.

##### *Souches de M. tuberculosis atténuées.*

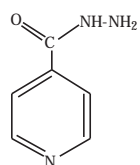
Parmi les différents types de vaccins envisageables, les souches de *M. tuberculosis* atténuées sont particulièrement intéressantes parce qu'elles pourraient conserver plus de

capacité immunogène que le BCG. Récemment, des souches auxotrophes de *M. tuberculosis* ont été développées. Parmi celles-ci, les souches auxotrophes pour la biosynthèse des bases purines (Jackson *et al.*, 1999), pour la proline, pour le tryptophane (Smith *et al.*, 2001) et pour la biosynthèse la vitamine B5 (Sambandamurthy *et al.*, 2002) sont des mutants dont la virulence est considérablement atténuée. Le mutant *purC*, déficient pour la production des bases purines est incapable de se multiplier dans les macrophages, mais confère une protection comparable à celle obtenue avec la souche vaccinale *M. bovis* BCG dans le modèle murin et dans le modèle cobaye. En outre, le mutant *proC* (déficient pour la production de proline) offre une protection semblable à celle générée par le BCG tandis que le mutant *trpD* (déficient pour la production du tryptophane) induit une meilleure protection que celle induite par le *M. bovis* BCG. Ces deux mutants représentent de bons espoirs vaccinaux puisqu'ils sont capables de persister dans le modèle murin pendant une durée supérieure à 10 mois (Smith *et al.*, 2001). La souche de *M. tuberculosis* auxotrophe pour la vitamine B5 est également intéressante puisqu'elle est capable de persister pendant plus de 7 mois aussi bien chez une souris immunodéficiente que chez une souris immunocompétente et induit une protection comparable à celle engendrée par le BCG (Sambandamurthy *et al.*, 2002).

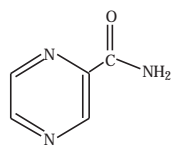
De manière étonnante, aucune de ces souches atténuées de *M. tuberculosis* ne donne une protection réellement meilleure par rapport à celle offerte par *M. bovis* BCG. Elles représentent néanmoins un point de départ intéressant pour tenter de développer un vaccin anti-tuberculeux plus performant.

#### *Les vaccins sous-unitaires et les vaccins à ADN.*

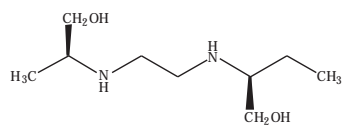
La maîtrise des méthodes de production et de purification d'antigènes ainsi que celles relatives à la manipulation de l'ADN est un espoir pour trouver un nouveau vaccin contre la tuberculose. De nombreux efforts ont été consentis à la recherche d'antigènes mycobactériens majeurs, mais très peu ont montré un pouvoir protecteur dans les modèles animaux (andersen, 1994 ; Brandt *et al.*, 2000 ; Horwitz *et al.*, 1995). Une étude a montré qu'il est par exemple possible d'induire une immunisation des souris contre l'infection par *M. tuberculosis* en leur injectant des plasmides contenant des gènes qui codent des protéines mycobactériennes sécrétées (Kamath *et al.*, 1999).



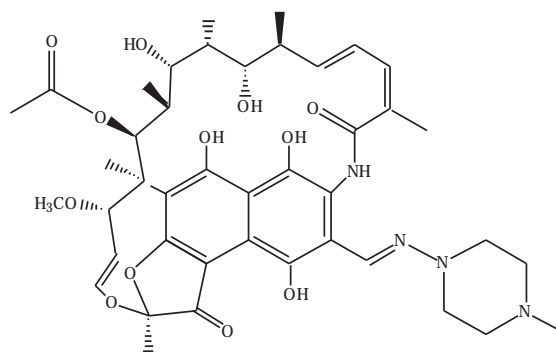
Isoniazide



Pyrazinamide



Ethambutol



Rifampicine

Figure 8 : drogues de première ligne

## ***IV.2 – La chimiothérapie***

La chimiothérapie antituberculeuse a commencé en 1944 avec l'utilisation de la streptomycine suivie de l'isoniazide en 1952 et de la rifampicine en 1966. Depuis ces dates décisives dans la lutte contre la tuberculose, d'autres antituberculeux ont été découverts et sont actuellement utilisés (pyrazinamide, éthambutol, fluoroquinolone etc...).

L'indice thérapeutique d'un antibiotique est le rapport entre la dose thérapeutique et la dose toxique. Sur cette base, il existe deux groupes d'antituberculeux : les antituberculeux dits de première ligne, qui possèdent un indice thérapeutique élevé, et les antituberculeux de seconde ligne présentant un indice thérapeutique plus faible.

### **IV.2.1 – Les antituberculeux de première ligne.**

Les antituberculeux de première intention sont l'isoniazide (INH), la pyrazinamide (PZA), l'éthambutol (EMB) et la rifampicine (RIF) (figure 8). Ils présentent tous un indice thérapeutique relativement élevé et sont généralement utilisés en combinaison chez des patients non immunodéprimés infectés par *M. tuberculosis*. Dans le cadre d'un traitement thérapeutique qui dure environ six mois, il est recommandé de prescrire aux patients tuberculeux l'INH, la RIF, l'EMB et le PZA pendant les deux premiers mois du traitement puis l'INH combiné avec la RIF, pendant les quatre mois suivants. Ce traitement thérapeutique de type court est souvent efficace, même dans le cas d'une infection par une souche de *M. tuberculosis* résistante à un des antibiotiques utilisés.

Le mode d'action de l'INH, de la PZA et de l'EMB sera décrit dans le chapitre suivant consacré à certaines drogues ayant pour cible l'enveloppe mycobactérienne.

La RIF et d'autres rifamycines sont utilisées dans le traitement de la tuberculose depuis 1966 (Grumbach *et al.*, 1967 ; Verbist & Gyselen, 1968). Ces antituberculeux sont également utilisés pour traiter la lèpre et d'autres infections causées par des mycobactéries atypiques chez des patients atteints du SIDA. Comme pour d'autres bactéries, la RIF inhibe la synthèse des ARNm chez *M. tuberculosis*, provoquant ainsi la mort du microorganisme par arrêt du processus de transcription (Levin & Hatfull, 1993). L'analyse et la caractérisation de mutants *M. tuberculosis* RIF-résistants révèlent des mutations dans le gène

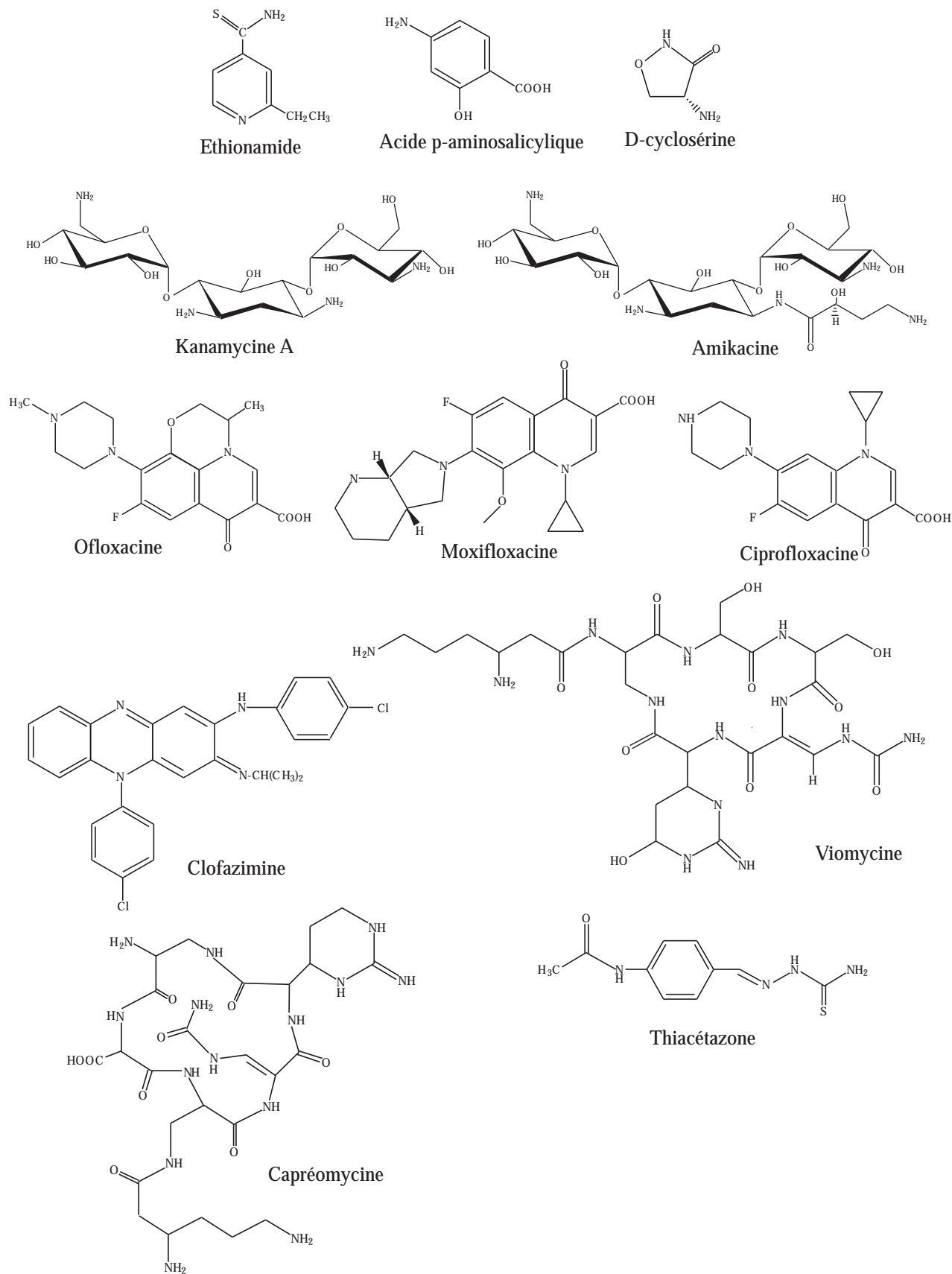


Figure 9 : drogues de seconde ligne.

*rpoB* codant la sous unité  $\beta$  de l'ARN polymérase de *M. tuberculosis* suggérant que ces mutations sont responsables du phénotype de résistance de ces souches (Telenti *et al.*, 1993).

#### IV.2.2 – Les antituberculeux de seconde ligne

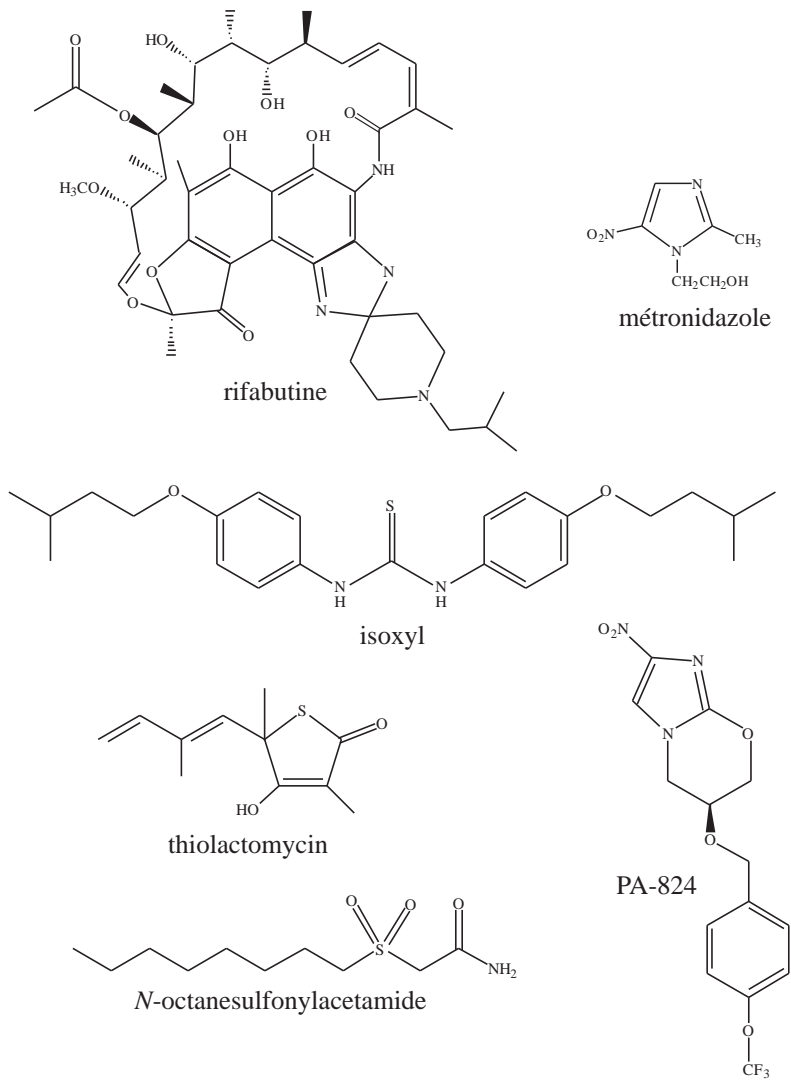
L'apparition de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antituberculeux de première intention est souvent due soit à l'incapacité économique des patients d'assumer l'achat régulier des antibiotiques, soit à un manque de rigueur dans l'observance du traitement prescrit.

Le traitement thérapeutique de patients infectés par ces souches est souvent personnalisé en fonction du résultat issu de tests de sensibilité des bacilles aux antibiotiques. Le traitement des souches de *M. tuberculosis* résistantes à deux ou à plusieurs antituberculeux de première ligne est souvent très long (environ 24 mois) et coûteux.

Les antituberculeux de seconde ligne (figure 9) ont un indice thérapeutique plus faible que les drogues de première ligne et sont donc réservés au traitement des TB-MDR (souches de *M. tuberculosis* multirésistantes aux drogues). Ils sont également utilisés pour traiter des individus immunodéprimés infectés par des mycobactéries atypiques telles que les mycobactéries du complexe *M. avium* ou MAC. La streptomycine, l'ETH, la capréomycine, la kanamycine, la viomycine, l'acide para-aminosalicylique et la thiacétazone sont les antituberculeux de seconde ligne les plus couramment utilisés.

Les progrès notés cette dernière décennie en génétique mycobactérienne ont permis une avancée considérable dans la compréhension du mode d'action de certains antimycobactériens ainsi que la découverte de leurs cibles moléculaires. Cependant les connaissances restent encore partielles pour la majorité des composés de seconde ligne.

La découverte de la streptomycine en 1944 marque le début de l'ère moderne de la thérapie chimique de la tuberculose. A cause des effets secondaires graves qu'il provoque sur l'audition et sur le fonctionnement des reins, cet antibiotique a depuis longtemps été relégué au rang d'antituberculeux de seconde intention dans les pays développés. Antibiotique bon-marché, il continue cependant d'être utilisé dans les pays en développement pour traiter la tuberculose chez l'adulte. L'activité antimicrobienne de la streptomycine et d'autres aminoglycosides (kanamycine, amikacine) ainsi que celle de la capréomycine, un antibiotique peptidique basique, se traduit par l'inhibition de la biosynthèse des protéines en se fixant irréversiblement sur la sous-unité ribosomique 30S,



**Figure 10** : quelques drogues antituberculeuses en développement.



empêchant ainsi l'initiation de la traduction de l'ARNm (Blanchard, 1996). Un des mécanismes courants de résistance à la streptomycine est l'acylation de la drogue par des enzymes de modification des aminoglycosides et dont les gènes sont généralement portés par des plasmides. Cependant, chez *M. tuberculosis*, 80 % des résistances sont dues à des mutations au niveau des gènes de la sous-unité ribosomique 30S.

Plusieurs fluoroquinolones sont actives *in vitro* contre des mycobactéries, mais seules quelques unes comme la ciprofloxacine, l'ofloxacine, la sparfloxacine, la lévofloxacine, la loméfloxacine (Bryskier & Lowther, 2002) et la moxifloxacine ont été cliniquement testées. Actuellement, suite à l'émergence de souches résistantes, l'utilisation des quinolones antimycobactériennes est relativement limitée. Comme chez d'autres espèces bactériennes, l'ADN gyrase mycobactérienne, une enzyme à deux sous-unités codée par *gyrA* et *gyrB*, constitue la cible primaire des quinolones. Des analyses génétiques de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux fluoroquinolones confirment la présence de mutations dans *gyrA* et/ou *gyrB* (Sullivan *et al.*, 1995 ; Takiff *et al.*, 1994).

D'autres antimycobactériens moins efficaces ne sont utilisés qu'en cas de multirésistances problématiques. La D-cyclosérine, un analogue de la D-alanine, bloque la synthèse du peptidoglycane par inhibition compétitive de la D-alanine racémase et de la D-alanine:D-alanine ligase. La clofazimine, une molécule de la famille des rimophenazines, est très peu tolérée et provoque des changements sur les pigments cutanés et des perturbations gastrointestinales. Pour son coût abordable la thiacétazone, substituant de l'acide para-aminosalicylique, est principalement utilisée dans les pays en développement (Davidson & Le, 1992).

#### **IV.2.3 – Les nouveaux antituberculeux, un enjeu pour le futur**

La prise régulière par les patients des antituberculeux prescrits est essentielle pour éviter la sélection de souches résistantes. Des traitements non rigoureusement suivis ou mal adaptés sont à l'origine de l'apparition de nombreuses souches multirésistantes qui, outre le problème de santé publique qu'elles posent, conduisent à la mise en place de plans d'antibiothérapie onéreux (Iseman *et al.*, 1993) et lourds de conséquences quant aux effets secondaires générés. La dissémination de ces souches multirésistantes aux antituberculeux rend nécessaire et urgente la découverte de nouvelles drogues efficaces. Récemment, de nouvelles drogues (figure 10) présentant une activité antimycobactérienne satisfaisante ont

été décrites (Kremer & Besra, 2002). Certaines d'entre elles, la thiolactomycine (Noto *et al.*, 1982 ; Slayden *et al.*, 1996), l'isoxyl (Phetsuksiri *et al.*, 1999) et le N-octanesulfonylacétamide (Parrish *et al.*, 2001) tuent les mycobactéries par inhibition de la biosynthèse des acides gras et des acides mycoliques. D'autres molécules prometteuses telles que le nitroimidazopyrane (NAP) et ses dérivés (Stover *et al.*, 2000) inhibent la croissance des mycobactéries en interférant avec la synthèse des protéines et des lipides. Ainsi, en administration orale, le PA-824, un des dérivés du NAP, est capable de réduire fortement la population mycobactérienne de la rate et des poumons de souris et de cobayes infectés, et ce avec une efficacité comparable à celle de l'INH (Stover *et al.*, 2000). Ces nouveaux composés ainsi que d'autres montrant une bonne efficacité *in vitro* restent à caractériser *in vivo* et représentent un espoir dans la lutte contre la tuberculose.

#### IV.2.4 – Stratégie de l'OMS : concept DOTS

Face à la recrudescence de la tuberculose et à la fréquence d'apparition de souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antituberculeux de première intention, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a récemment élaboré un protocole d'antibiothérapie connu sous le nom de DOTS, pour *Directly Observed Therapy Short-Course* (Bayer & Wilkinson, 1995). Ce programme a pour objectif de suivre l'incidence réelle de la tuberculose et de traiter le plus grand nombre de cas, le plus rapidement possible, tout en évitant l'apparition et la dissémination des souches de *M. tuberculosis* résistantes aux antituberculeux. L'idée maîtresse du protocole DOTS repose sur une surveillance directe de la prise des antibiotiques prescrits aux patients. Cette surveillance, assurée par du personnel médical mandaté par les autorités sanitaires de chaque pays ou par l'OMS, est essentielle pour optimiser les possibilités de guérison des malades.

Cette stratégie se traduit chaque année par un recul significatif de la tuberculose à l'échelle planétaire ainsi que de la fréquence d'apparition de souches multirésistantes. Face à l'urgence et pour des raisons de commodité, les traitements sont standardisés et sont basés uniquement sur les antituberculeux de première ligne. Le traitement prévu par le protocole DOTS n'étant pas adapté aux cas d'infection par une ou plusieurs souches multirésistantes (Coninx *et al.*, 1999 ; Espinal *et al.*, 2000), l'OMS a récemment introduit le protocole DOTS-plus qui prend en compte la résistance des souches de *M. tuberculosis* afin d'adapter le traitement (Farmer & Kim, 1998).

La stratégie de lutte contre la tuberculose développée par l’OMS a certes permis un ralentissement notable de l’épidémie dans les pays qui appliquent cette stratégie, mais elle ne suffit pas pour espérer éliminer la maladie. En effet, le coût élevé des médicaments et parfois le manque d’éducation des populations sont deux facteurs qui à eux seuls compliquent la possibilité d’éradication de la tuberculose. De plus, le traitement sous surveillance nécessite une énorme logistique et une coopération à long terme des autorités locales. Pour ces raisons, l’OMS soutient la recherche fondamentale et, selon ses recommandations, un des axes de recherche pouvant contribuer à faire reculer la tuberculose est la compréhension du mode d’action des antituberculeux.

## **V – LES ANTIMYCOBACTERIENS DIRIGES CONTRE LA PAROI**

## V – Les antimycobactériens dirigés contre la paroi

Un nombre significatif d'antimycobactériens ont pour cible des enzymes de synthèse de la paroi. Leur efficacité s'explique par le rôle déterminant de la paroi des mycobactéries pour leur survie dans l'organisme hôte. De plus, nombre des enzymes de la biosynthèse de la paroi sont spécifiques des procaryotes, voire même des mycobactéries, ce qui réduit pour l'homme les risques de toxicité des inhibiteurs de ces enzymes.

### V.1 – La pyrazinamide

La PZA est un dérivé de nicotinamide synthétique. Alors que l'activité antituberculeuse de la PZA a été démontrée en 1952, c'est seulement dans la seconde moitié des années 1980s que cet antibiotique a commencé à être utilisé à grande échelle.

Bien que la PZA soit assez peu efficace contre *M. tuberculosis in vitro* à pH neutre, cette molécule montre une grande efficacité contre la tuberculose aussi bien chez l'homme que dans les modèles animaux. La PZA a la particularité d'être préférentiellement active contre des populations de bacilles en semi-dormance tels que ceux présents dans les tubercules. En réalité, la PZA révèle une très bonne activité antimycobactérienne à pH acide (5,6) et contre des bacilles de Koch phagocytés par des monocytes, ce qui suggéra très tôt une activation de la molécule en milieu acide (MacKanness, 1956 ; McDermott & Tompsett, 1954). En 1967, Konno a montré que la PZA n'a aucune activité antimycobactérienne intrinsèque, mais que seule sa forme dérivée, l'acide pyrazinoïque, possède une activité antibiotique (Konno *et al.*, 1967).

Contrairement aux autres membres du complexe *M. tuberculosis*, *M. bovis* n'est pas sensible à la PZA, tant dans un milieu à pH acide que dans les monocytes. Cependant, tous les membres du complexe *M. tuberculosis*, y compris *M. bovis* sont sensibles à l'acide pyrazinoïque et à la 5-chloro-pyrazinamide (5-Cl-PZA), deux dérivés de la PZA. Il a fallu attendre 1996 pour que PncA, la pyrazinamidase responsable de l'activation de la PZA, soit enfin identifiée (Scorpio & Zhang, 1996). Comme attendu, PncA catalyse la conversion de la pyrazinamide en acide pyrazinoïque (POA), forme active de l'antibiotique. Chez *M. bovis*, le gène *pncA* porte une mutation à l'origine d'une enzyme inactive, expliquant ainsi la

résistance naturelle de *M. bovis* à cet antibiotique. Certains isolats cliniques de *M. tuberculosis* résistants à la PZA présentent des mutations dans le gène *pncA*. En outre, d'autres isolats résistants à la PZA présentent un défaut dans le système de transport de la PZA (Raynaud *et al.*, 1999), indiquant que la sensibilité des mycobactéries à la PZA dépend non seulement de la présence d'une PZase fonctionnelle, mais aussi d'un système de transport de la PZA non fonctionnel. L'identification de la cible primaire du POA fait l'objet de controverses. En effet, en septembre 2000, l'équipe de W. Jacobs a annoncé que FAS-I est la cible primaire de la PZA et de la 5-Cl-PZA chez *M. tuberculosis* (Zimhony *et al.*, 2000). Deux ans plus tard, l'équipe de C. Barry argumentait que si la 5-Cl-PZA est bien capable d'inhiber l'activité de FAS-I mycobactérien purifié, il n'en est rien pour la PZA (Boshoff *et al.*, 2002).

## V.2 – L'éthambutol

L'EMB est un antituberculeux synthétique de première intention. Son activité antimycobactérienne a été documentée pour la première fois en 1961. L'EMB est un bactériostatique qui provoque l'arrêt de l'incorporation des acides mycoliques dans l'enveloppe mycobactérienne. En effet, le traitement de *M. smegmatis* à l'EMB conduit assez rapidement à l'accumulation intracellulaire d'acides mycoliques libres et de tréhaloses mono- (TMM) et dimycolates (TDM) (Kilburn & Takayama, 1981). L'EMB est un inhibiteur du métabolisme de l'arabinose ; il inhibe en particulier la biosynthèse de l'arabinogalactane (Takayama & Kilburn, 1989), l'accepteur final des acides mycoliques fournis par le TMM et de TDM. L'EMB inhibe également la synthèse du LAM (Khoo *et al.*, 1996). Des études génétiques ont permis de définir le locus *emb* comme codant les cibles moléculaires de l'éthambutol chez *M. tuberculosis* (Telenti *et al.*, 1997) et chez *M. avium* (Belanger *et al.*, 1996). Le locus *emb* est un opéron de trois gènes nommés *embA*, *embB* et *embC* chez *M. tuberculosis* ou *embR*, *embA* et *embB* chez *M. avium*. Chez *M. avium*, *embR* coderait un régulateur homologue à un activateur transcriptionnel de *Streptomyces*, tandis que *embAB* coderait deux arabinosyltransférases responsables de la polymérisation de l'arabinose sur la chaîne arabinane de l'arabinogalactane. Au sein du locus *emb*, *embA* et *embB* semblent être les cibles moléculaires de l'EMB, puisque la surexpression de *embAB* conduit à un phénotype de résistance de *M. avium* à l'EMB (Belanger *et al.*, 1996). L'analyse de la séquence du locus *embCAB* issu d'isolats cliniques de *M. tuberculosis*

résistant à l'EMB confirme la présence de mutations ponctuelles conduisant à des changements dans la séquence d'acides aminés (Sreevatsan *et al.*, 1997 ; Telenti *et al.*, 1997). Toutefois, les mécanismes d'action de l'éthambutol demeurent à ce jour inconnus.

### ***V.3 – L'isoxy***

Utilisé dans les années 1960s pour le traitement de la tuberculose, l'isoxy (ISO, 4,4'-diisoamyloxythiocarbanilide, thiocarlide) est un antibiotique à large spectre d'action également efficace sur les mycobactéries. En monothérapie, l'efficacité thérapeutique de l'ISO reste modeste (Titscher, 1966 ; Urbancik, 1970). Ainsi, après un traitement à l'ISO pendant un minimum de 10 semaines, 50 % des patients tuberculeux ne présentent plus de bacilles dans leurs expectorations (Kampelmann, 1970). Schmid (Schmid, 1970) a montré que la combinaison de l'ISO avec l'INH est plus efficace qu'une monothérapie avec chacune des drogues. Plus récemment, on a montré que l'activité inhibitrice de la croissance mycobactérienne par l'ISO est provoquée par l'arrêt de la biosynthèse des acides mycoliques (Phetsuksiri *et al.*, 1999 ; Winder *et al.*, 1971). Face à la recrudescence de souches tuberculeuses multirésistantes, cet antibiotique a été récemment réétudié. Ainsi, Phetsuksiri et collègues ont montré que l'ISO est active contre des souches cliniques de TB-MDR. Les auteurs ont ensuite synthétisé et évalué un panel de dérivés d'ISO, dont plusieurs se sont avérés plus efficaces que la molécule initiale. Ils ont également montré que l'ISO est capable de tuer des *M. tuberculosis* intramacrophagiques proportionnellement à la dose, avec une faible toxicité pour les macrophages en culture primaire (Phetsuksiri *et al.*, 1999). L'efficacité et la faible toxicité de certains dérivés de l'ISO représentent un réel espoir pour traiter des cas de bacilles tuberculeux multirésistants. Bien qu'il soit clairement établi que l'ISO est un inhibiteur des acides mycoliques, sa cible moléculaire reste cependant à identifier.

### ***V.4 – La thiolactomycine***

La TLM est un antibiotique naturel produit par des bactéries telluriques du genre *Nocardia* (Oishi *et al.*, 1982 ; Sasaki *et al.*, 1982). La TLM est très active *in vivo* contre plusieurs bactéries pathogènes, y compris contre *M. tuberculosis* (Miyakawa *et al.*, 1982 ;

Noto *et al.*, 1982). La TLM inhibe la synthèse des acides gras et des acides mycoliques chez *M. smegmatis*. Plus spécifiquement, la TLM inhibe la synthèse de la chaîne longue des  $\alpha$ -mycolates et des époxymycolates, mais n'affecte que peu la synthèse de la chaîne courte des  $\alpha'$ -mycolates. Ces observations sont interprétées comme une inhibition spécifique du système FAS-II avec, par contre, une innocuité du système FAS-I (Slayden *et al.*, 1996). Cette hypothèse a été récemment confortée par la démonstration que la surproduction des enzymes KasA et KasB du système FAS-II génère un phénotype de résistance de *M. tuberculosis* à la TLM, suggérant en outre que ces enzymes sont les cibles de cet antibiotique (Kremer *et al.*, 2000).

La synthèse chimique de plusieurs dérivés de la TLM a permis d'identifier des molécules hautement actives contre les mycobactéries y compris contre *M. tuberculosis* (Kremer, *et al.*, 2000). Ces dérivés s'avèrent d'autant plus efficaces que leurs chaînes latérales sont longues (Kremer *et al.*, 2000).

### ***V.5 – L'isoniazide***

L'INH ou acide isonicotinique hydrazide est l'antibiotique synthétique le plus utilisé dans le traitement de la tuberculose. Il est utilisé en combinaison avec d'autres antituberculeux de première ligne, mais également avec certains antituberculeux de seconde intention ou avec certains nouveaux antituberculeux. Toutes les mycobactéries du complexe *M. tuberculosis* sont sensibles à l'INH et leur croissance est inhibée à partir d'une concentration de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  d'INH. Malgré son efficacité, l'INH n'a qu'un rôle restreint dans la thérapie des infections causées par d'autres espèces mycobactériennes. Des études publiées dans les années 1970s montrent que l'INH est un puissant inhibiteur de la biosynthèse des acides mycoliques (Takayama *et al.*, 1972 ; Winder & Collins, 1970). En 1992, une équipe de recherche anglaise a permis d'avancer considérablement dans la compréhension du mécanisme d'action de l'INH en constatant que des isolats cliniques de *M. tuberculosis* résistants à l'INH présentent une activité catalase relativement faible associée à un défaut de virulence chez les cobayes. L'analyse génétique de ces isolats cliniques a permis de conclure que des mutations au sein du gène *katG* étaient responsables du phénotype de résistance à l'INH. Par ailleurs, des expériences de complémentation de *M. smegmatis* INH-résistants par une copie sauvage du gène *katG* ont permis la restauration du phénotype sensible à l'INH. Enfin, une délétion dans le gène *katG* est associée à



l'hyperrésistance de deux isolats cliniques de *M. tuberculosis* à l'INH (Zhang *et al.*, 1992). Ces travaux ont ainsi permis de démontrer que l'INH est une pro-drogue activée en une forme toxique par KatG, une protéine possédant à la fois une activité catalase et une activité peroxidase (Zhang *et al.*, 1992).

De récentes études montrent que la réductase de l'énoyl-AcpM à NADH (InhA) est une cible moléculaire de l'INH (Banerjee *et al.*, 1994 ; Larsen *et al.*, 2002). La forme active de l'INH est capable de former avec le cofacteur NAD(H) un complexe covalent qui se fixe dans le site actif de InhA (Basso *et al.*, 1998 ; Rozwarski *et al.*, 1998), empêchant ainsi la réaction de réduction de l'énoyl-AcpM en acyl-AcpM, précurseur des acides mycoliques. Des évidences basées sur l'inactivation du gène *inhA* chez *M. smegmatis* (Vilcheze *et al.*, 2000) ou sur la surexpression de *inhA* chez différentes espèces mycobactériennes (Larsen *et al.*, 2002) confirment que InhA constitue la cible primaire de l'INH chez les mycobactéries. Chez *M. tuberculosis*, des mutations dans *katG* constituent la source de résistance à l'INH la plus répandue (Heym *et al.*, 1995 ; Slayden & Barry, 2000b). Alternativement, des mutations dans le promoteur du gène *inhA* surviennent dans 20 à 34 % des isolats cliniques résistants répertoriés.

Un autre mécanisme de résistance de *M. tuberculosis* à l'INH couramment observé est celui qui survient suite à des mutations dans le gène *ndh* (NADH déshydrogénase) codant une protéine de la chaîne respiratoire. L'absence d'une Ndh fonctionnelle conduit à une diminution du taux d'oxydation du NADH et à une augmentation du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> intracellulaire conduisant à la disparition des complexes INH-NAD, essentiels pour inhiber l'activité de InhA.

En plus des mécanismes classiques de résistance à l'INH, on rencontre occasionnellement des membres du complexe *M. tuberculosis* INH-résistants contenant des mutations dans le promoteur du gène *ahpC* codant l'alkyle hydroperoxidase, une enzyme impliquée dans la détoxification des peroxydes organiques.

Une étude publiée en 1998 propose que KasA serait la cible primaire de l'INH (Mdluli *et al.*, 1998). Ce travail argumente que l'INH serait capable de former un complexe avec AcpM et KasA. Cependant, plus récemment, il a été montré qu'une surproduction de KasA ne confère aucune résistance de *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG et *M. tuberculosis* à l'INH (Larsen *et al.*, 2002). En outre, si l'existence du complexe INH-AcpM-KasA chez *M. smegmatis* traité à l'INH a été confirmée par des anticorps anti-KasA, l'apparition de ce complexe est systématiquement associée à une production constante de protéine KasA libre

apparemment suffisante pour assurer la biosynthèse des acides mycoliques (Kremer *et al.*, 2003).

### ***V.6 – L'éthionamide***

L'éthionamide (ETH, 2-éthylisothionictinamide) est un composé synthétique de la famille des thioamides. L'ETH a été synthétisé par David Libermann et ses collaborateurs en 1956. La même année fut établi le caractère antituberculeux de l'ETH dans le modèle murin et dans le modèle cobaye. L'ETH est actif contre la plupart des bacilles tuberculeux résistants aux antituberculeux usuels, et en particulier, sur une majorité des bacilles isoniazido-résistants (Rist, 1960). Les concentrations minimales inhibitrices de l'ETH contre la souche de *M. tuberculosis* H37Rv *in vitro* et *in vivo* sont respectivement de 0,6 µg/ml et 0,25 µg/ml (Rist, 1960). Son activité dans la tuberculose pulmonaire de l'homme est comparable à celle observée au cours de l'expérimentation chez le cobaye. *In vitro*, l'ETH sulfoxydé est plus active sur les bacilles que l'ETH non transformé.

Bien que très efficace, l'ETH a cependant le défaut de provoquer des nécroses hépatiques (Donald *et al.*, 1987 ; Pattyn *et al.*, 1984) tant chez l'animal que chez l'homme. Cette relative toxicité hépatique est responsable de son classement au rang d'antituberculeux de seconde ligne. L'étude des mécanismes d'hépatotoxicité de l'ETH a été initiée dès 1974 par deux chercheurs indiens au départ de fractionnements de foies de cobayes homogénéisés, indiquant que l'activité enzymatique responsable de la S-oxydation de l'ETH est contenue dans les microsomes. Ces expériences montrent en outre que l'ETH n'est métabolisé par des préparations microsomales qu'en présence de NADPH. (Kumarasmawy, 1974). L'enzyme purifiée et active, de couleur jaune, a un spectre d'absorption comparable à celui du coenzyme FAD. En outre, l'enzyme purifiée (85 kDa) nécessite aussi bien de l'oxygène que du NADPH pour catalyser la réaction d'oxydation de l'éthionamide. L'enzyme hépatique responsable de la sulfoxydation a ensuite été purifiée de la fraction microsomale et identifiée comme une monooxygénase à FAD (FMO, *flavin-containing monooxygenase*) (Kumarasmawy, 1974). Ces résultats ont plus tard été confortés par la démonstration que le méthimazole, un inhibiteur spécifique des FMO, réduit de façon drastique l'oxydation de l'ETH par les microsomes de foie de rat, tandis que le métyrapone et le n-octylamine, des inhibiteurs spécifiques de monooxygénases à cytochromes P450, n'ont qu'un faible effet sur l'oxydation de l'ETH (Ruse & Waring, 1991).

Comme l'INH, l'ETH est un puissant inhibiteur de la biosynthèse des acides mycoliques. Les mycobactéries traitées à l'ETH présentent une perturbation dans la biosynthèse des acides mycoliques, avec notamment une forte inhibition des acides mycoliques oxygénés et une légère diminution des mycolates di-insaturés (Quemard *et al.*, 1992), indiquant que la cible de l'ETH est une enzyme agissant précocement dans le processus de biosynthèse des acides mycoliques. La caractérisation d'un mutant de *M. smegmatis* résistant à la fois à l'ETH et à l'INH a permis d'identifier une cible commune à ces deux antibiotiques (Banerjee *et al.*, 1994 ; Zhang, 1993). Cette cible est une énoyl-réductase du système FAS-II impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques et est codée par le gène *inhA*.

Malgré leur ressemblance structurale et leur cible commune, l'ETH et l'INH ne présentent cependant pas de résistances croisées systématiques. Ainsi, certaines souches de *M. tuberculosis* résistantes à l'ETH restent sensibles à l'INH tandis que des souches INH-résistantes montrent une légère augmentation de la sensibilité à l'ETH (Winder, 1982). Ces observations sont donc en contradiction apparente avec l'existence d'une cible commune pour les deux antibiotiques.

Il a été démontré que la catalase-peroxydase KatG est capable de métaboliser l'INH en une forme toxique pour les mycobactéries. En outre, la surexpression de *katG* ne confère pas aux mycobactéries un phénotype de résistance à l'ETH, indiquant que KatG n'a pas d'influence sur l'action antimycobactérienne de l'ETH. Dans cette introduction, nous avons souligné que l'ETH est métabolisé en ETH S-oxyde par des flavine-monooxygénases hépatiques. Par ailleurs, une étude a montré que la S-oxydation de la thioacétamide, un composé de la même famille que l'ETH, par des microsomes de foie de rats conduit à la formation d'un complexe covalent constitué de protéines et de métabolites de la thioacétamide (Dyroff & Neal, 1981). L'ensemble de ces observations suggère que l'oxydation de l'ETH génère des dérivés électrophiles capables de s'associer de manière covalente à des protéines cibles telle que l'InhA.

## **VI – REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE**

## VI – Régulation transcriptionnelle

Comme tous les organismes vivants, les bactéries sont soumises à des variations de conditions environnementales qui exigent la mise en place de mécanismes d'adaptation essentiels à leur survie. Dans ce contexte, les bactéries pathogènes évoluent dans un environnement particulièrement hostile où certaines d'entre elles parviennent malgré tout à survivre. Outre les molécules naturellement présentes dans l'environnement des bactéries, d'autres molécules tels que les antibiotiques utilisés à des fins thérapeutiques, provoquent également chez ces microorganismes une situation de stress contre laquelle les bactéries finissent par développer une réponse à moyen ou à long terme. Généralement, la réponse à la variation des conditions environnementales se traduit au niveau moléculaire, par une modulation de l'expression de gènes qui eux-mêmes assurent une stimulation de la production de certaines protéines et/ou une inhibition d'autres protéines. Dès lors, une meilleure compréhension de la pathogenèse et des mécanismes de résistance aux antimicrobiens passe par l'étude de ces mécanismes de régulation.

La régulation transcriptionnelle est le mécanisme majeur de modulation de l'expression génétique chez les procaryotes. Les éléments de base impliqués dans la régulation transcriptionnelle sont l'ARN polymérase (ARNpol) et les promoteurs. L'ARNpol catalyse la synthèse de l'ARNm à partir d'une matrice d'ADN tandis que les promoteurs sont des sites de reconnaissance spécifiques de l'ARNpol sur l'ADN. En outre, selon les conditions de croissance bactérienne, d'autres éléments tels que les activateurs, les répresseurs et les antiterminateurs peuvent influencer le niveau de transcription d'un gène ou d'un groupe de gènes.

Dans ce chapitre, nous décrivons quelques aspects de la régulation transcriptionnelle qui faciliteront la compréhension d'une partie du travail développé dans les résultats et la discussion.

### *VI.1 – L'ARN polymérase et les facteurs sigma*

L'ARN polymérase bactérienne est une enzyme oligomérique composée de 5 sous-unités dont 4 ( $\alpha_2\beta\beta'$ ) forment le cœur stable du complexe (*core factor*) ou E et une

sous-unité appelée facteur sigma ( $\sigma$ ). E est l'unité catalytique qui assure l'élongation du transcrit, mais il est incapable d'initier seul la transcription d'un gène. Le facteur  $\sigma$  est la sous-unité qui interagit de manière transitoire avec E pour former l'holoenzyme ARN polymérase ( $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ) active. Le facteur  $\sigma$  confère à l'ARNpol la capacité de se fixer de manière spécifique sur un promoteur, permettant ainsi l'initiation de la transcription du gène. Le facteur  $\sigma$  reconnaît des séquences consensus sur la séquence promotrice du gène à transcrire. Ces séquences consensus constituent les boîtes  $-35$  et  $-10$  qui sont respectivement les séquences TTGACA et TATAAT pour le facteur  $\sigma^{70}$  de *E. coli*. Les boîtes  $-35$  et  $-10$  sont situées en amont du point d'initiation de la transcription (+1) et sont les sites d'interaction avec les acides aminés clés des motifs hélice-tour-hélice (HTH) présents sur le facteur  $\sigma$ .

Il existe deux types de facteurs  $\sigma$  : les facteurs  $\sigma$  majeurs et les facteurs  $\sigma$  alternatifs. A l'exemple du facteur  $\sigma^{70}$  de *E. coli*, les  $\sigma$  majeurs gouvernent la biosynthèse de la majorité des ARNm dans les cellules en phase exponentielle de multiplication et sont essentiels pour la croissance, tandis que les facteurs  $\sigma$  alternatifs conduisent à l'expression de différents ensembles de gènes, souvent en réponse à des variations de conditions environnementales. Tous les facteurs  $\sigma$  majeurs et la plupart des facteurs  $\sigma$  alternatifs ont un motif HTH très conservé et semblable à celui du facteur  $\sigma^{70}$  de *E. coli*. Les autres facteurs  $\sigma$  alternatifs présentent un motif HTH proche de celui du facteur  $\sigma^{54}$  de *E. coli* (Merrick *et al.*, 1987). Cette famille comprend entre autre les facteurs  $\sigma$  requis pour la fixation de l'azote et la biosynthèse des pili et des flagelles. En plus des facteurs  $\sigma$  alternatifs, des activateurs et des répresseurs modulent l'activité de l'ARNpol. Les répresseurs se fixent sur des séquences dites opératrices qui chevauchent souvent le promoteur ou le nucléotide +1 de la transcription, bloquant ainsi l'initiation de la transcription. En revanche, les activateurs facilitent l'interaction entre l'ARNpol et le promoteur par fixation du domaine carboxy-terminal de la sous unité  $\alpha$  ou du facteur  $\sigma$  sur la séquence en amont du site de fixation de l'ARNpol (Gralla, 1996). La production des facteurs  $\sigma$ , des répresseurs et des activateurs de la transcription peut être modulée au niveau de leur expression par des modifications d'interactions covalentes, ou par fixation à d'autres cofacteurs ou à des protéines régulatrices.

## VI.2 – Les facteurs sigma mycobactériens

Le séquençage complet et l'annotation du génome de *M. tuberculosis* H37Rv a permis d'identifier 13 gènes codant potentiellement des facteurs  $\sigma$  (Cole *et al.*, 1998). Nombre de ces gènes possèdent des homologues chez d'autres espèces mycobactériennes mais la composition de *M. tuberculosis* en facteur  $\sigma$  n'est pas représentative de toutes les espèces mycobactériennes. A titre d'exemple, le facteur  $\sigma^F$  présent chez *M. tuberculosis* et chez d'autres mycobactéries à croissance lente est absent chez les mycobactéries à croissance rapide (DeMaio *et al.*, 1996). Tous les facteurs  $\sigma$  identifiés chez *M. tuberculosis* appartiennent à la famille des facteurs  $\sigma^{70}$ .

*Sigma A* ( $\sigma^A$ ). Le facteur  $\sigma^A$  de *M. tuberculosis* est codé par le gène *sigA* et présente une forte similarité avec le facteur  $\sigma$  majeur de *Streptomyces coelicolor*. Le facteur  $\sigma^A$  est essentiel chez les mycobactéries (Gomez *et al.*, 1998) et contrôle l'expression de la plupart des gènes de ménage mycobactériens. Toutefois, une mutation ponctuelle responsable de la substitution de l'Arg<sub>522</sub> en His, identifiée chez *M. bovis* ATCC 35721 provoque l'atténuation de la virulence de cette souche (Collins *et al.*, 1995).

*Sigma B* ( $\sigma^B$ ). Contrairement à  $\sigma^A$ , le facteur  $\sigma^B$  n'est pas essentiel chez les mycobactéries (Gomez *et al.*, 1998). Le facteur  $\sigma^B$  semble être impliqué dans le développement de la réponse à certains stress. En effet, la concentration intracellulaire de  $\sigma^B$  augmente fortement lorsque *M. tuberculosis* est placé en condition de microaérophilie, en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS) et en condition de haute température (Manganelli *et al.*, 1999). En outre, il a été montré qu'une mutation dans *sigB* conduit à un phénotype d'hypersensibilité de *M. smegmatis* au peroxyde d'hydrogène, suggérant que ce mutant présente un défaut d'adaptation au stress oxydatif.

*Les facteurs sigma de la famille ECF*. Parmi les 13 gènes codant des facteurs  $\sigma$  potentiels, dix (*sigC, D, E, G, H, I, J, K, L* et *M*) appartiennent au groupe des facteurs ECF (*extracytoplasmic function*). Les facteurs  $\sigma$  de la famille ECF jouent un rôle important dans la coordination de la transcription des gènes, aussi bien au cours du développement morphologique que durant la mise en place de la réponse à la plupart des stress rencontrés par les bacilles. En plus de leur forte homologie de séquences, les facteurs  $\sigma$  ECF se

distinguent des autres facteurs  $\sigma$  par le fait qu'ils sont co-transcrits avec un ou plusieurs facteurs anti- $\sigma$ . Les anti- $\sigma$  possèdent un domaine capteur extracytoplasmique et un domaine inhibiteur intracellulaire (Helmann, 2002) qui fixe un facteur  $\sigma$  correspondant, l'empêchant de jouer son rôle dans la transcription. Un signal extracellulaire devra être perçu par l'anti- $\sigma$ , permettant alors la libération du facteur  $\sigma$  par le domaine intracellulaire et son interaction avec l'ARN polymérase.

L'étude de la transcription et l'analyse de mutants de différents facteurs  $\sigma$  alternatifs de *M. tuberculosis* a montré que ces gènes sont exprimés de manière différentielle. Ainsi, bien que toujours capable de se multiplier dans les macrophages, une souche de *M. tuberculosis* mutante pour le gène *sigH* est plus sensible à l'élévation de la température et au stress oxydatif que la souche parentale sauvage (Manganelli *et al.*, 2002). En outre, parmi 48 gènes de *M. tuberculosis* spécifiquement induits par l'exposition du bacille au diamide, 39 se révèlent être sous la dépendance de  $\sigma^H$ . Certains de ces gènes codent des protéines potentiellement impliquées dans le métabolisme des thiols, dans la biosynthèse de la cystéine et de la molybdoptérine. D'autres gènes  $\sigma^H$ -dépendants codent des régulateurs transcriptionnels. C'est le cas de *sigB*, *sigE* et *sigH* lui-même (Manganelli *et al.*, 2002).

Parallèlement, l'inactivation de *sigE* conduit à une augmentation de la sensibilité de *M. tuberculosis* H37Rv à la température, au SDS et au stress oxydatif. *M. tuberculosis* H37Rv déficient pour *sigE* est également incapable de croître dans les macrophages inactivés et il est plus sensible à l'activité bactéricide des macrophages murins activés que la souche sauvage (Manganelli *et al.*, 2001), suggérant que  $\sigma^E$  contrôle certains gènes impliqués dans la réponse à quelques stress environnementaux et dans la survie intracellulaire des mycobactéries.  $\sigma^E$  contrôlerait l'expression d'une vingtaine de gènes dont *sigB*.

L'analyse du génome de *M. tuberculosis* permet de prédire l'existence de 8 autres facteurs  $\sigma$  alternatifs de la famille ECF. Seuls 5 d'entre eux, *sigC*, *sigD*, *sigG*, *sigI* et *sigM* semblent être effectivement exprimés (Manganelli *et al.*, 1999). Le gène *sigM*, ainsi que son homologue *sloA* chez *M. smegmatis*, sont inductibles lorsque les mycobactéries sont exposées à de fortes températures. A l'inverse, *sigI* est induit lorsque les bacilles sont soumis à de basses températures (Manganelli *et al.*, 1999).

*Sigma F* ( $\sigma^F$ ). Le gène *sigF* code un facteur  $\sigma$  qui n'appartient pas à la famille des ECF. Il est homologue à *sigF* de *Streptomyces coelicolor* et à *sigB* et *sigF* de *Bacillus*

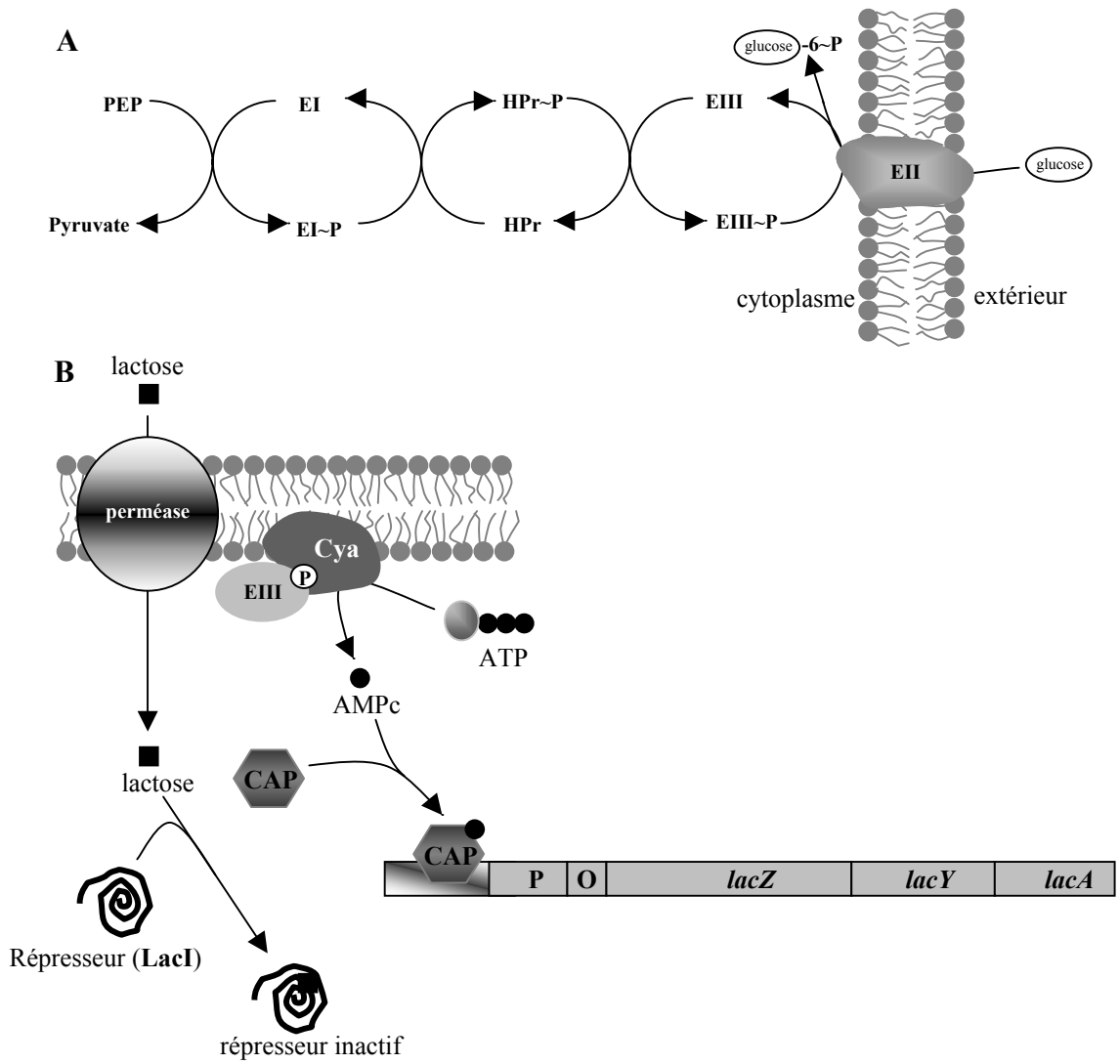


*subtilis*. Le facteur  $\sigma^F$  de *S. coelicolor* et  $\sigma^F$  de *B. subtilis* sont impliqués dans le processus de sporulation tandis que  $\sigma^B$  de *B. subtilis* contrôle un opéron induit durant la phase stationnaire et en réponse à différents stress (Haldenwang, 1995). La transcription de *sigF* est induite pendant la phase stationnaire et lorsque *M. tuberculosis* est soumis à différents antimycobactériens ou à un stress oxydatif (Chen *et al.*, 2000 ; Michele *et al.*, 1999). La délétion du gène *sigF* chez *M. tuberculosis* CDC 1551 provoque une augmentation aberrante de la densité de population en phase stationnaire. Le mutant est en outre fortement sensible à la rifampine et à la rifapentine, suggérant que le facteur  $\sigma^F$  est impliqué dans la résistance à ces antimycobactériens (Chen *et al.*, 2000). Bien qu'il ne semble pas être requis pour la multiplication dans le macrophage,  $\sigma^F$  serait cependant nécessaire pour la survie à long terme des bacilles dans l'organisme hôte (Chen *et al.*, 2000). La production de  $\sigma^F$  est régulée par le facteur anti- $\sigma$  UsfX. Il a été montré *in vitro* que UsfX est capable de séquestrer  $\sigma^F$ , empêchant ainsi la transcription des gènes *usf* (upstream of sigma factor). UsfX est lui-même sous le contrôle de deux inhibiteurs : RsfA régulé par le potentiel redox de la cellule, et RsfB qui serait régulé par un mécanisme de phosphorylation (Beaucher *et al.*, 2002). Cet exemple reflète la complexité de la régulation de l'expression de gènes impliqués dans différents mécanismes d'adaptation aux variations environnementales.

Ces différentes études montrent que les facteurs  $\sigma$ , tant les facteurs  $\sigma$  majeurs que les facteurs  $\sigma$  alternatifs jouent un rôle important dans l'expression des gènes liés à la virulence et à l'adaptation du bacille tuberculeux aux conditions environnementales.

### ***VI.3 – La régulation positive***

La régulation transcriptionnelle positive regroupe les mécanismes permettant d'augmenter le niveau d'expression d'un gène. Le mécanisme de régulation positive classique est une stimulation de l'initiation de la transcription par fixation d'un activateur au voisinage de la boîte -35 du promoteur. Les promoteurs régulés par des activateurs ont généralement un taux d'expression basal faible. Les protéines activatrices augmentent la vitesse ou l'efficacité de formation du complexe ARNpol-promoteur en modifiant la formation du complexe fermé, la formation du complexe ouvert ou les deux à la fois. Un des activateurs les mieux caractérisés est la protéine allostérique fixatrice d'AMP cyclique (AMPC) appelée CAP. Après complexation à l'AMPC, CAP augmente d'environ 20 fois la



**Figure 11** : A, système de transport des sucres chez *E. coli* et *S. typhimurium*. Système de transfert de phosphate grâce aux phosphotransférases (PTS). B, Régulation de l'expression de l'opéron *lac* par le complexe CAP-AMPc. Le lactose est capable de se fixer sur le répresseur LacI qui devient incapable de reconnaître la séquence opératrice (O), située en aval du promoteur. Parallèlement, le complexe CAP-AMPc se fixe en amont du promoteur de l'opéron pour induire la transcription de celui-ci.

capacité d'interaction de l'ARNpol avec le promoteur de l'opéron lactose. L'activité d'autres protéines régulatrices peut être modulée par une modification covalente comme dans le cas par exemple de la protéine PhoB, qui n'active la transcription du régulon Pho qu'une fois phosphorylée.

Un autre mode de régulation positive, moins bien étudié, met en jeu la méthylation de l'ADN. Dans la plupart des cas, la méthylation de l'ADN dans la région du promoteur a un effet négatif sur l'initiation de la transcription. Comme l'ADN nouvellement répliqué n'est pas méthylé instantanément, il existe de façon transitoire, en arrière de la fourche de réplication, une région d'ADN hémiméthylée. Tant que l'ADN est dans cet état, il peut être plus facilement transcrit. Cette situation favoriserait une vague d'initiation de la transcription suivant le déplacement de la fourche de réplication.

### VI.3.1 – L'activation de l'opéron lactose

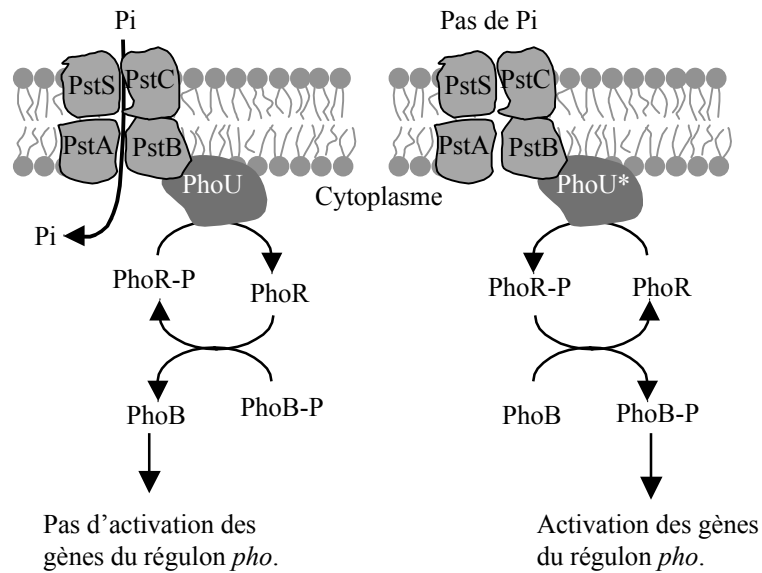
L'opéron lactose est un ensemble de gènes impliqués dans l'utilisation du lactose comme source de carbone par la bactérie. Ces gènes, *lacZ*, *lacY* et *lacA* sont sous la dépendance d'un promoteur unique. Chez *E. coli* et *Salmonella typhimurium* par exemple, l'expression de l'opéron *lac* n'est activée qu'en présence de son inducteur, le lactose, tandis que le glucose ou d'autres sucres simples provoquent son inhibition. Pour comprendre comment l'opéron *lac* est activé, il convient d'abord d'expliquer comment les sucres sont transportés vers le milieu intracellulaire, le transport des sucres étant étroitement lié à l'expression de l'opéron *lac*.

Les sucres sont transportés à l'intérieur de la cellule bactérienne grâce à un système phosphotransférase (PTS, *phosphotransferase system*) qui assure la phosphorylation du sucre une fois à l'intérieur de la cellule (figure 11A). Ce système relativement complexe est constitué de trois enzymes (EI, EII et EIII) et d'une petite protéine thermostable (HPr) chez *E. coli* et chez *S. typhimurium*. Les protéines EI et HPr sont cytoplasmiques ; EII est une protéine transmembranaire qui joue le rôle de transporteur de sucre et EIII est soit cytoplasmique, soit adsorbée au feuillet interne de la membrane plasmique. Les protéines EI, HPr, EIII et EII forment une chaîne de transporteurs qui prélèvent des groupes phosphate riches en énergie sur le phosphoénolpyruvate (PEP) et les transfèrent au sucre qui doit pénétrer dans la cellule. Les deux premiers transporteurs (EI et HPr) sont identiques dans toutes les chaînes PTS tandis que EII et EIII sont spécifiques d'une famille de sucres de

structure apparentée ; par conséquent, les bactéries produisent une série d'enzymes EII et EIII différentes.

Les bactéries entériques utilisent plusieurs procédés pour assurer au glucose le statut de source de carbone prioritaire. Parmi ces différents procédés, la répression catabolique est un mécanisme produisant une inhibition quasiment totale de la synthèse d'enzymes inductibles telles que les enzymes de l'opéron *lac*. Bien que la répression catabolique soit un mécanisme fort complexe, il est cependant clairement établi que l'expression de l'opéron *lac* est sous la dépendance du complexe CAP-AMPc (CAP, *catabolite gene activator protein* ; AMPc, *adénosine monophosphate cyclique*) (figure 11B). CAP, produit du gène *crp* (*cAMP receptor protein*) est une protéine homodimérique (22,5 kDa/monomère) qui fixe une molécule d'AMPc sur chaque sous-unité ; c'est le complexe CAP-AMPc qui se fixe à l'ADN. Dans le système multigénique de l'opéron *lac*, la fixation du complexe CAP-AMPc au promoteur est essentielle pour l'initiation de la transcription de l'opéron (figure 11B). Comme nous l'avons vu plus haut, une fois le complexe CAP-AMPc fixé, l'ARNpol se fixe à son tour aux signaux de transcription avec une très forte amplitude par rapport à son activité basale, aboutissant *de facto* à une augmentation de la fréquence de transcription de l'opéron. Dans les cellules cultivées dans un milieu contenant du glucose comme source de carbone, le niveau d'AMPc intracellulaire reste relativement faible expliquant le fait que dans ces conditions, le niveau du complexe CAP-AMPc reste également bas. En revanche, cultivées sur lactose, les bactéries présentent un niveau d'AMPc très élevé et donc un niveau fortement augmenté du complexe CAP-AMPc.

Comment l'AMPc devient-il l'indicateur précis d'une insuffisance en glucose ? L'AMP cyclique peut être rapidement synthétisé par l'adénylate-cyclase (Cya, codée par le gène *cya*), et rapidement dégradé par une phosphodiesterase. C'est le taux de synthèse qui est le déterminant primaire du niveau cellulaire d'AMPc. La Cya est une enzyme membranaire dont l'activité dépend de l'état de l'enzyme EIII ; EIII est phosphorylée de manière réversible. Pour que Cya soit activée, il faut que EIII soit phosphorylée (EIII-P). Lorsque le glucose est transporté, le niveau de EIII-P est bas puisque le groupe phosphate est transféré sur le glucose pour former du glucose-6-phosphate. Quand il n'y a pas de molécules de glucose à transporter, le niveau de EIII-P augmente brutalement ; Cya devient plus active, synthétise de manière accrue l'AMPc, d'où une élévation du niveau intracellulaire du complexe CAP-AMPc qui explique l'élévation de l'expression de l'opéron *lac*.



**Figure 12 :** Modèle de régulation du régulon *pho* chez *E. coli*. D'après Wanner, 1987. Pi, phosphate inorganique ; PstA, PstB, PstS et PstC sont des constituants du système de transport du phosphate ; PhoU, capteur détectant Pi ; PhoU\*, forme du capteur en absence de Pi intracellulaire ; PhoR et PhoR-P, forme non phosphorylée et forme phosphorylée du transducteur du signal ; PhoB et PhoB-P, forme native et forme phosphorylée de l'activateur du régulon *pho*.

Un autre acteur joue un rôle important dans l'expression de l'opéron lactose, c'est le gène *lacI*. Transcrit en sens inverse par rapport à l'opéron *lac*, le gène *lacI* code un répresseur (LacI) de l'opéron. En effet, en absence d'inducteur LacI se fixe sur un site particulier de l'ADN, l'opérateur, situé en amont du premier codon de la phase ouverte de lecture du gène *lacZ*, empêchant ainsi toute transcription de l'opéron. En présence de lactose, celui-ci va interagir avec LacI qui devient inactive suite à un changement de conformation et est incapable de reconnaître l'opérateur. Parallèlement à cet événement, le complexe CAP-AMPc vient se fixer en amont du promoteur pour activer la transcription de l'opéron *lac*.

### VI.3.2 – Régulation de l'acquisition du phosphate

Le phosphate inorganique (Pi) est abondant dans certains milieux naturels et constitue la source de phosphore de la plupart des bactéries. Pourtant, étant donné l'insolubilité de nombreux sels de phosphate, les bactéries ont mis au point au cours de l'évolution des systèmes efficaces pour acquérir du phosphore en condition de carence en phosphate inorganique. La phosphatase alcaline (PhoA, 43 kDa) joue un rôle majeur dans la dégradation des esters phosphoriques. En condition limitante en phosphate, PhoA est fortement produite sous forme de monomères inactifs qui s'assemblent dans le périplasma en dimères actifs. L'induction du gène codant la phosphatase alcaline (*phoA*) a fait l'objet de nombreuses études et on sait maintenant qu'il fait partie d'une réponse complexe à la limitation en phosphate.

Les gènes du réseau Pho sont contrôlés par un régulateur positif qui se fixe à leurs promoteurs pour activer leur transcription. Ce régulateur, PhoB, se fixe à des sites spécifiques de l'ADN uniquement lorsque le phosphate est limitant. La fixation de PhoB est modulée par son interaction avec une autre protéine régulatrice, PhoR. Il semblerait que PhoR active PhoB en la phosphorylant. La protéine PhoR semble être associée à la membrane cytoplasmique, laissant supposer que cette protéine est capable de percevoir la disponibilité du Pi à l'extérieur de la cellule, et de transmettre ce signal à PhoB. Toutefois, des études génétiques indiquent que PhoR reçoit également une information sur la disponibilité du phosphate grâce à son interaction avec une troisième protéine, PhoU. Il semble que la protéine PhoU stimule PhoR qui à son tour active PhoB. Comment PhoU obtient-elle l'information ? Des analyses génétiques montrent que son rôle de capteur dépend de quatre autres protéines appelées PstS, PstC, PstA et PstB, qui ensemble forment

un système transportant le Pi avec une grande efficacité : le système PST. Les cinq gènes - *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* et *phoU*- constituent un opéron transcrit dans cet ordre.

La figure 12 représente les grandes lignes du modèle couramment admis du fonctionnement normal du réseau de l'utilisation du phosphate. Cependant, il a été présenté un modèle alternatif dans lequel PhoR détecte directement la disponibilité du phosphate dans le périplasme. Au cours de la croissance de bactéries en présence d'une quantité adéquate de phosphate, le système PST fonctionne de telle façon que PhoU est dans un état où elle conduit PhoR à avoir une activité phosphatase dirigée vers PhoB. Dans sa forme déphosphorylée, PhoB ne peut jouer son rôle d'activateur de la transcription du gène *phoA*, ni des autres gènes de l'opéron *psi* qu'elle contrôle (Stock *et al.*, 1989). Lorsque le phosphate du milieu s'épuise, il s'opère un changement de flux au travers du système PST, et l'interaction des protéines PST avec PhoU conduit celle-ci à stimuler la fonction kinase putative de PhoR. La protéine PhoR phosphorylerait PhoB qui, dans cet état, peut stimuler la transcription des opérons qui constituent ses cibles, en particulier *phoA* (Stock *et al.*, 1989). La phosphatase alcaline est alors produite en grande quantité, ainsi que d'autres protéines utilisées pour l'assimilation du phosphate à partir de divers sources alternatives.

Dans ce modèle, le chemin qui va du stimulus à la réponse peut être analysé comme suit : le *stimulus* est la carence en phosphate dans le milieu extérieur, le *capteur*, le complexe PST-PhoU, le *signal*, est sans doute la phosphorylation d'une protéine, le *transducteur* du signal est PhoR, le *régulateur*, PhoB ; en *sortie*, on trouve les protéines codées par les opérons qui, tels *phoA*, requièrent la fixation de PhoB pour être actifs, et la *réponse* est l'amélioration de l'approvisionnement en phosphate nécessaire à différentes réactions d'anabolisme. Il est à noter que dans ce système PhoB contrôle à la fois l'opéron *pst-phoU* et l'opéron *phoR-phoB*.

#### ***VI.4 – La régulation négative***

Les répresseurs, régulateurs négatifs qui se fixent aux opérateurs pour diminuer l'activité des promoteurs, ressemblent aux activateurs en ce sens qu'ils modifient, chez les promoteurs régulés, soit la formation du complexe fermé, soit la formation du complexe ouvert. On trouve les sites de fixation des répresseurs à des positions variées par rapport au promoteur qu'ils contrôlent. Ces positions varient, d'en amont de la région -35, en aval de la région -10 du promoteur. Certains gènes et certains opérons possèdent deux sites de fixation

du répresseur bien séparés. On pense que les molécules du répresseur fixées sur ces sites interagissent entre elles et courbent ainsi le segment d'ADN qui les sépare, formant un large complexe ADN-répresseur.

Pour être physiologiquement utile, l'activité d'un répresseur doit pouvoir être modulée. Comme les activateurs, de nombreux répresseurs sont des protéines allostériques qui présentent une certaine conformation en l'absence de leur ligand spécifique et une autre lorsque celui-ci s'est fixé à elles. Moins fréquemment, les répresseurs peuvent être modifiés de façon covalente ou subir un clivage protéolytique (cas de LexA).

Dans les sous-paragraphes qui vont suivre, nous allons évoquer quelques cas de régulateurs négatifs.

#### VI.4.1 – Réponse SOS

Au cours de la croissance bactérienne, les bactéries peuvent subir des dommages sur leur chromosome. Pour réparer l'ADN endommagé, les procaryotes augmentent l'expression de gènes impliqués dans la machinerie de synthèse et de réparation de l'ADN. Cette réaction des bactéries est connue sous le nom de réponse SOS. Chez *E. coli* et chez la majorité des bactéries à Gram négatif, les gènes de la réponse SOS sont sous la dépendance du répresseur LexA (Walker, 1996). En absence de stress, cette protéine se fixe sur une séquence appelée boîte SOS ou boîte DIN (*damage inducible*) [CTGT(AT)<sub>4</sub>CAG] située dans la région promotrice de gènes SOS-induits, causant leur répression. Lorsque l'ADN est endommagé, la protéine RecA devient active et va induire un autoclivage de LexA. La protéine LexA clivée a une faible activité de fixation sur les opérateurs de gènes inductibles, conduisant à une dérpression des gènes. Les gènes codant les protéines LexA et RecA ont eux aussi des boîtes SOS, sont réprimés par LexA, et sont induits par la détérioration de l'ADN via le même mécanisme. *B. subtilis* possède dans son génome un gène orthologue à *lexA*, le gène *dinR*, mais son domaine de fixation ainsi que son site de fixation (boîte DinR - CAACNNNNGTTC) sur les gènes cibles, sont différents de ceux de la protéine LexA des bactéries à Gram négatif (Winterling *et al.*, 1998). Les régions promotrices du gène *lexA* de *M. tuberculosis* et du gène *recA* de *M. tuberculosis*, *M. leprae* et *M. smegmatis*, contiennent des boîtes DinR. La protéine LexA de *M. tuberculosis* est capable de se fixer sur ces régions (Durbach *et al.*, 1997 ; Movahedzadeh *et al.*, 1997). Le gène *recA* est induit lorsqu'on expose *M. tuberculosis* à des agents mutagènes, et quand bien même cette exposition est



courte et faible, celle-ci conduit à une inactivation de LexA, comme c'est le cas chez les autres bactéries.

#### VI.4.2 – Régulation de l'acquisition du fer par IdeR

Les procaryotes contrôlent l'acquisition du fer en modulant négativement la transcription des gènes codant les composants impliqués dans les systèmes d'assimilation du fer. Chez *Corynebacterium diphtheriae*, DtxR est le répresseur des gènes d'acquisition du fer (Tao *et al.*, 1994). Lorsque cette protéine s'associe avec son co-répresseur  $Fe^{2+}$ , elle devient capable de réprimer l'expression de gènes enrôlés dans l'acquisition du fer, en se fixant sur une séquence palindromique conservée de la région promotrice de ces gènes. Cette séquence, TWAGGTTAG(G/C)CTAACCTWA, où W est soit A ou T, est appelée boîte DtxR (Lee *et al.*, 1997 ; Tao & Murphy, 1994). En condition de carence en fer, la protéine DtxR se détache de son co-répresseur et perd sa capacité à reconnaître les promoteurs de gènes de l'acquisition du fer, conduisant ainsi à la levée de leur répression. Cet événement mène à une augmentation de la synthèse de la machinerie d'acquisition du fer et par conséquent, à une élévation du niveau de fer intracellulaire qui aboutit à la formation du complexe DtxR- $Fe^{2+}$  et donc à la répression des gènes d'assimilation du fer.

IdeR, un orthologue structural et fonctionnel de DtxR a été décrit chez les mycobactéries (Doukhan *et al.*, 1995 ; Pohl *et al.*, 1999 ; Schmitt *et al.*, 1995) et identifié comme étant un répresseur des principaux sidérophores de *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*. Des études ont montré qu'une inactivation du gène *ideR* conduit à une expression constitutive des sidérophores (mycobactines et exochéline) chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* (Dussurget *et al.*, 1996).

Récemment, plusieurs gènes mycobactériens impliqués dans l'acquisition du fer et régulés par le fer et la protéine IdeR ont été décrits. Le gène *fxbA* code une formyltransférase nécessaire pour la biosynthèse de l'exochéline chez *M. smegmatis*. Ce gène est réprimé par de fortes concentrations en fer, et sa région promotrice contient une séquence similaire à la boîte Dtx décrite plus haut (Fiss *et al.*, 1994). L'inactivation du gène *ideR* de *M. smegmatis* provoque une dérégulation de la transcription du gène *fxbA*, montrant que la répression Fer-dépendante du gène *fxbA* est médiée par la protéine IdeR (Dussurget *et al.*, 1999). La séquence consensus du site de fixation de DtxR à l'ADN a été utilisée comme sonde pour rechercher des gènes éventuellement régulés par IdeR chez *M. tuberculosis* H37Rv. Environ 30 gènes candidats ont été identifiés. La séquence consensus de la boîte IdeR putative de ces

**Tableau 2** : Quelques régulateurs transcriptionnels procaryotes dont la structure a été résolue. Adapté d'une revue de Huffman et Brennan (2002). Un seul régulateur de *M. tuberculosis* (IdeR) a une structure connue.

Protéine	Organisme	+/- ADN*
<b>Hélice-tour-hélice</b>		
LacI	<i>E. coli</i>	+
Rob	<i>E. coli</i>	+
NtrC	<i>S. typhimurium</i>	-
TetR	<i>E. coli</i>	+
QacR	<i>S. aureus</i>	+
FlhD	<i>E. coli</i>	-
TyrR	<i>H. influenzae</i>	-
GerE	<i>B. subtilis</i>	-
AraC	<i>E. coli</i>	-
<b>Winged-helix</b>		
BirA	<i>E. coli</i>	-
PhoB	<i>E. coli</i>	-
MuR	Phage Mu	+/-
BmrR	<i>B. subtilis</i>	+
ModE	<i>E. coli</i>	-
SarR	<i>S. aureus</i>	-
FadR	<i>E. coli</i>	+/-
MarR	<i>E. coli</i>	-
MtaN	<i>B. subtilis</i>	-
ArgR	<i>B. stearothermophilus</i>	-
DtxC	<i>C. diphtheriae</i>	+
IdeR	<i>M. tuberculosis</i>	-

\*structure du régulateur fixé (+) ou non (-) à l'ADN cible.

gènes a récemment été déduite (TWAGGTWAG(G/C)CTWACCTWA) par Rodriguez et ses collaborateurs.

Les huit premiers gènes étudiés fixent tous la protéine IdeR au niveau des sites de reconnaissance prédits (Rodriguez *et al.*, 1999). L'expression de sept d'entre eux est réprimée par le fer dans la souche sauvage, mais dérégulée dans un mutant *M. tuberculosis* n'exprimant pas le gène *ideR* (Rodriguez *et al.*, 1999). Parmi ces gènes, on note deux gènes codant des mycobactines (*mbtA* et *mbtB*) et un troisième gène codant la carboxymycobactine (*mbtI*) (De Voss *et al.*, 1999 ; Quadri *et al.*, 1998). On note également la présence du gène *bfrA* qui coderait la bactérioferritine, une protéine participant au stockage du fer chez les mycobactéries. Contrairement aux sept autres gènes, *bfrA* est régulé positivement par la fixation directe du complexe IdeR-Fe<sup>2+</sup> sur l'ADN.

#### VI.4.3 – Les répresseurs de la famille TetR/CamR

Plusieurs protéines impliquées dans la régulation de la transcription des gènes bactériens et capables d'interagir avec l'ADN par l'intermédiaire d'un motif hélice-tour-hélice (HTH) situé à l'extrémité amino-terminale peuvent être classées en différentes familles sur la base de la similarité de leurs séquences d'acides aminés. Parmi ces familles de régulateurs, on trouve les régulateurs de la famille TetR/CamR. La famille TetR/CamR est une famille de répresseurs de transcription dont plusieurs régulent des gènes impliqués dans des processus membranaires tels que la perméabilité (Namwat *et al.*, 2001), la formation des pompes à efflux essentielles à la résistance des bactéries à certains antibiotiques ou à des ammoniums quaternaires (Grkovic *et al.*, 2002). D'autres répresseurs régulent des gènes impliqués dans l'utilisation de certains composés comme source de carbone et comme source d'azote (Koga *et al.*, 1986 ; Nakada *et al.*, 2001) et dans la biosynthèse d'acides aminés (Rey *et al.*, 2003). Certains régulateurs de la famille TetR/CamR contrôlent également l'expression de gènes de virulence (Santangelo *et al.*, 2002) et celle de facteurs sigma (Kojic *et al.*, 2002). Si tous les membres de la famille TetR/CamR sont très ressemblants au niveau de leur région amino-terminale de fixation à l'ADN, leur région carboxy-terminale est cependant très divergente.

A quelques exceptions près, les répresseurs de la famille TetR/CamR ont une masse moléculaire qui varie entre 20 et 25 kDa et fixent un opérateur de 15 pb environ et qui sont

dans la majorité des cas, des séquences inversées répétées ou des séquences répétées directes.

Le motif HTH consiste en deux hélices groupées selon un angle de 120°. Le motif HTH seul n'est apparemment pas suffisant pour permettre un repliement correct ; une troisième hélice  $\alpha$  permet la stabilisation du motif HTH en une structure compacte constituant un domaine globulaire (Huffman & Brennan, 2002). Au sein du motif HTH, la seconde hélice est appelée "hélice de reconnaissance", car c'est elle qui s'insère à l'intérieur du sillon majeur de l'ADN. Elle est cruciale pour la spécificité d'interaction.

Presque tous les régulateurs de la famille TetR/CamR se fixent sur l'ADN sous forme homodimérique et chaque motif HTH du dimère interagit avec une moitié de la séquence opératrice. Toutefois, un cas de fixation tétramérique a récemment été décrit (Schumacher *et al.*, 2001)

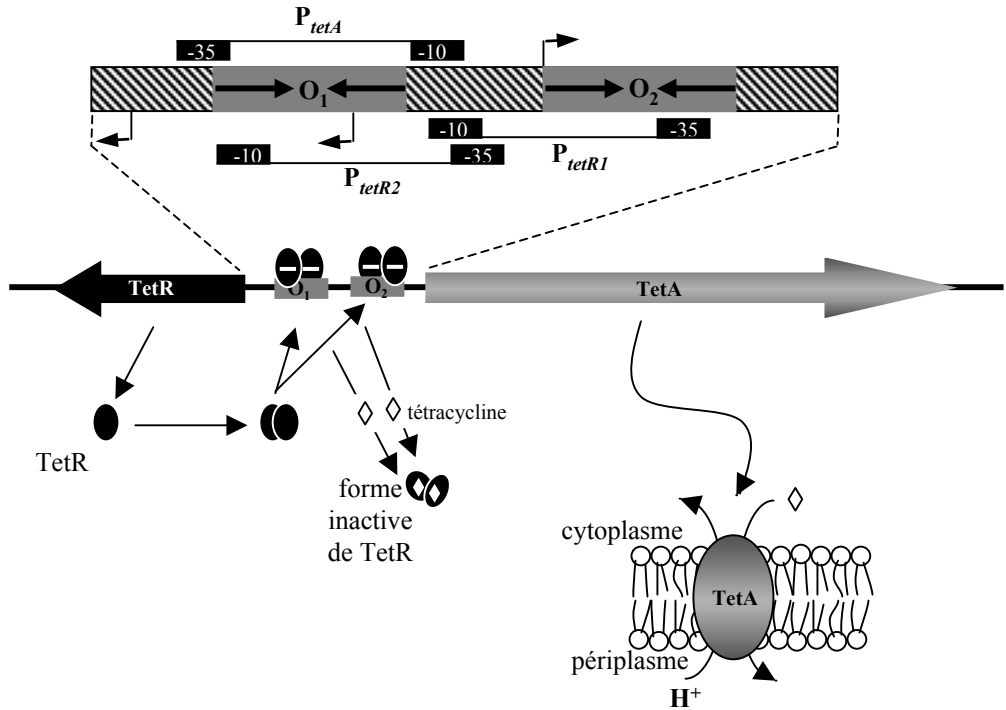
De façon générale, les régulateurs transcriptionnels de la famille TetR/CamR régulent négativement l'initiation de la transcription de leur propre gène et leur activité de fixation à l'ADN est souvent contrôlée par de petites molécules synthétisées par l'organisme (Namwat *et al.*, 2001) ou provenant du milieu extracellulaire (Grkovic *et al.*, 2002 ; Hillen & Berens, 1994). L'interaction du régulateur avec ces molécules conduit à un changement conformationnel à l'origine de la perte de capacité de fixation du régulateur à l'ADN. Il s'en suit ainsi une dérégulation du ou des gènes contrôlés.

#### **VI.4.3.a – Régulateurs modulant la synthèse des pompes à efflux : cas de TetR, QacR et BarA/VarR**

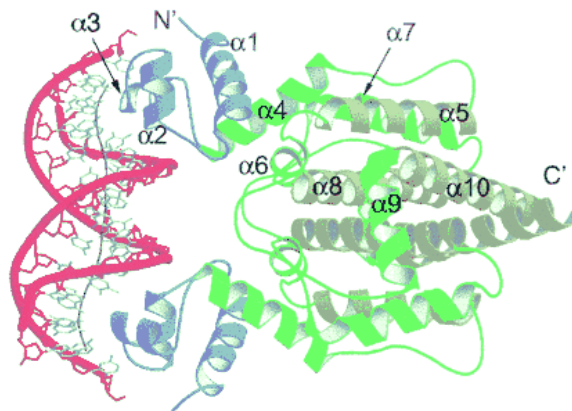
##### *Le régulateur TetR*

La forme de résistance à la tétracycline la plus commune chez les bactéries à Gram négatif est sans doute celle causée par la présence du transposon Tn10 dans le chromosome de certaines souches. Le locus *tet* codant les gènes de résistance est constitué de deux gènes *tetR* et *tetA* transcrits en sens inverse l'un par rapport à l'autre. La région intergénique *tetR-A* est une région courte de 81 pb.

TetA est une protéine transmembranaire qui forme une pompe à efflux proton-motrice au sein de la membrane cytoplasmique bactérienne. Cette pompe assure



**Figure 13** : Contrôle de la transcription de *tetA* par TetR. La région intergénique *tetA-R* contenant les opérateurs *tet* (*O<sub>1</sub>* et *O<sub>2</sub>*) et les promoteurs est représentée. Le promoteur de *tetA* (*P<sub>tetA</sub>*), les deux promoteurs *tetR* (*P<sub>tetR1</sub>* et *P<sub>tetR2</sub>*) ainsi que leurs points d'initiation de la transcription sont également indiqués.



**Figure 14** : Structure du complexe dimère TetR-ADN. D'après Orth *et al.* (2000).

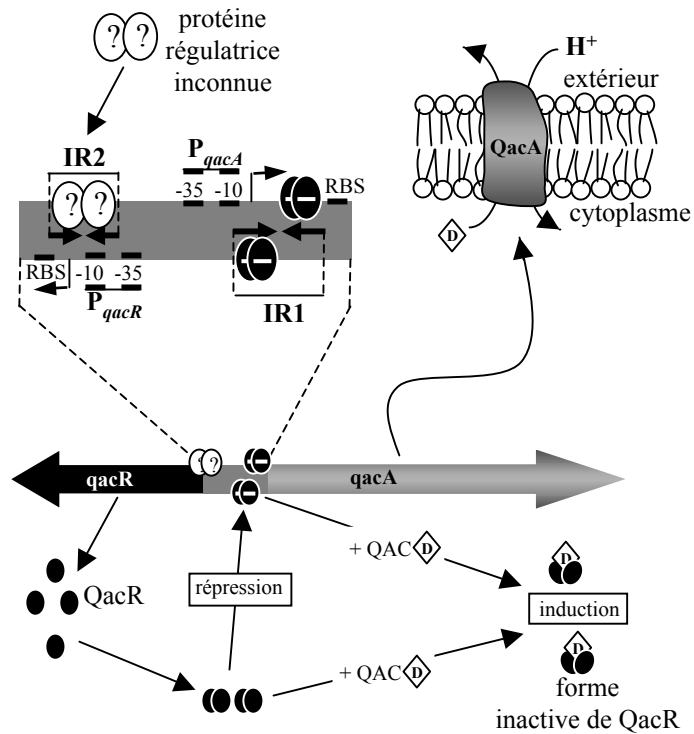
l'exportation de la tétracycline intracellulaire complexée au cation divalent  $Mg^{2+}$  (Grkovic *et al.*, 2002). L'expression du gène *tetA* est contrôlée négativement par le produit du gène *tetR* (TetR, 23 kDa) (Grkovic *et al.*, 2002). En absence de tétracycline, la protéine TetR se fixe avec une forte affinité sur les opérateurs *tet*, entraînant la répression du gène *tetA* (figure 13). *A contrario*, lorsque les bactéries à Gram négatif possédant le locus *tet* sont traitées par la tétracycline, le complexe tétracycline- $Mg^{2+}$  ([tc- $Mg^{2+}$ ]) interagit avec TetR, provoquant un changement conformationnel de la protéine. Ce changement conformationnel du régulateur est à l'origine de la perte de l'affinité du régulateur pour son opérateur, conduisant ainsi à la levée de la répression du gène *tetA* (Hinrichs *et al.*, 1994). De plus, la protéine TetR a une plus grande affinité pour la forme intracellulaire de l'antibiotique que la drogue n'en a pour les ribosomes, favorisant ainsi une bonne expression de *tetA* avant que la synthèse de la protéine ne soit à nouveau inhibée (Hillen & Berens, 1994).

La protéine TetR est produite sous forme d'homodimères qui se fixent de manière non coopérative sur deux séquences inversées répétées (IR) adjacentes, de 19 pb chacune (opérateurs *tet* O<sub>1</sub> et O<sub>2</sub>). O<sub>1</sub> et O<sub>2</sub>, dont la composition nucléotidique est différente, chevauchent respectivement les promoteurs des gènes *tetA* et *tetR*. Des études ont montré que TetR a environ 4 fois plus d'affinité pour O<sub>2</sub> que pour O<sub>1</sub> (Kleinschmidt *et al.*, 1991) et que l'interaction de TetR avec O<sub>1</sub> provoque une répression de la transcription des gènes *tetA* et *tetR* tandis que la fixation de TetR sur O<sub>2</sub> conduit à la répression du gène *tetA* uniquement (Meier *et al.*, 1988). Cette stratégie permet aux bactéries de toujours disposer d'une quantité minimum de régulateur afin d'éviter une synthèse accidentelle du transporteur.

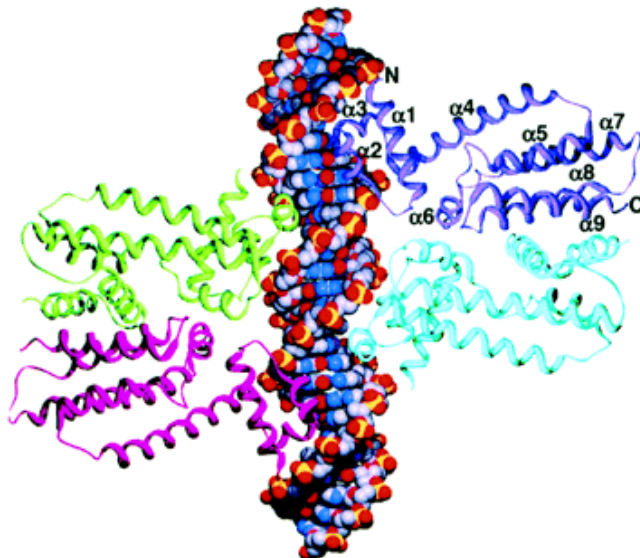
La structure de TetR établie par cristallographie montre que cette protéine est constituée de 10 hélices  $\alpha$  (Hinrichs *et al.*, 1994). Dans chaque chaîne polypeptidique de l'homodimère, ce sont les hélices  $\alpha 1$  à  $\alpha 3$  qui forment le domaine de fixation à l'opérateur tandis que les hélices  $\alpha 5$  à  $\alpha 10$  constituent le corps de la protéine associé au domaine de fixation à l'ADN par l'intermédiaire de l'hélice  $\alpha 4$  (figure 14) (Orth *et al.*, 2000). Il a été montré que dans le complexe TetR-ADN, chacun des motifs HTH du dimère interagit avec le grand sillon correspondant de l'opérateur tandis que le petit sillon demeure découvert. Exceptées les 3 pb centrales de l'opérateur, TetR est en contact direct avec 15 pb de l'opérateur (Orth *et al.*, 2000).

### *Le régulateur QacR*

La résistance de certaines souches de *Staphylococcus aureus* aux antiseptiques et aux désinfectants est typiquement associée avec la présence, dans ces organismes, d'un plasmide



**Figure 15** : Modèle de régulation de l'expression de *qacA* chez *S. aureus*. QacR réprime l'expression de *qacA* en se fixant sous forme tétramérique sur la région promotrice de *qacA* ( $P_{qacA}$ ). Plusieurs ammonium quaternaires (D) sont exportés de la cellule en échange de protons ( $H^+$ ). Les molécules D sont également ligands de QacR. Leur fixation sur QacR est à l'origine d'un changement conformationnel du dimère QacR qui devient incapable de reconnaître l'ADN. Le point de départ du transcrit de *qacA*, le promoteur de *qacA* ainsi que l'opérateur de QacR (IR1) sont indiqués. Une protéine inconnue se fixe sur IR2.



**Figure 16** : Structure du complexe formé par une paire de dimère QacR fixée à l'opérateur. D'après Schumacher *et al.* (2002).

portant les facteurs de résistance à divers ammoniums quaternaires ou QACs (*quaternary ammonium compounds*) qui sont des cations organiques très toxiques (Behr *et al.*, 1994). Ces facteurs de résistance sont codés par les gènes *qacA* et *qacB* dont les produits d'expression forment dans la membrane plasmique une pompe à efflux qui permet à la bactérie de se débarrasser des composés QACs. QacA utilise la force proton-motrice pour réaliser l'efflux de plusieurs composés toxiques monovalents, bivalents, cationiques et lipophiliques. Les substrats de la pompe QacA sont des antimicrobiens idéaux dans le sens où leur charge positive les attire vers l'intérieur de la bactérie qui est plutôt chargé négativement par rapport au milieu extracellulaire. De plus, la nature lipophile de certains d'entre eux aide leur traversée de la membrane plasmique. De fait, plusieurs substrats de QacA sont utilisés soit en application clinique comme antibactériens (Grkovic *et al.*, 2002), soit en application ménagère comme antiseptiques.

Le gène *qacR*, transcrit en sens inverse par rapport aux gènes *qacA* et *qacB*, code le répresseur de la transcription des gènes *qacA/B* (figure 15) (Grkovic *et al.*, 1998). L'analyse de la protéine QacR révèle en région amino-terminale, un motif HTH typique des régulateurs transcriptionnels de la famille TetR/CamR. Contrairement à la plupart des membres de la famille TetR qui interagissent avec un opérateur de 15 pb environs, QacR reconnaît la séquence IR1 (28 pb) localisée dans la région intergénique (177 pb) *qacR-A*. La séquence IR1 est située immédiatement en amont du promoteur du gène *qacA* ( $P_{qacA}$ ). En absence de composés QACs, la protéine QacR se fixe sur le site IR1 et régule négativement la transcription du gène *qacA*. La présence de QACs dans la bactérie induit un changement conformationnel de la protéine QacR qui perd ainsi sa capacité à reconnaître la séquence IR1. Il s'ensuit une augmentation de la transcription de *qacA* (Grkovic *et al.*, 1998). Ainsi, de la même manière que TetR, QacR agit comme un détecteur qui, en présence des molécules toxiques QACs, permet une augmentation du niveau de transcription de *qacA*. L'analyse de la région intergénique *qacR-qacA* révèle la présence d'une séquence IR2 très apparentée aux opérateurs *tet*, mais cette séquence n'interagit pas avec QacR *in vitro* (Grkovic *et al.*, 1998). Ainsi, contrairement au paradigme TetR, aucune auto-régulation de *qacR* n'a pu être mise en évidence.

La protéine QacR contient 9 hélices  $\alpha$  (Schumacher *et al.*, 2002). Comme ses congénères de la famille TetR/CamR, QacR s'auto-assemble en dimère. Cependant, l'analyse structurale par cristallographie montre que le complexe QacR-IR1 est constitué de deux homodimères QacR-QacR fixés sur une séquence nucléotidique de 23 pb (figure 16) (Schumacher *et al.*, 2002). Les hélices  $\alpha_1$  à  $\alpha_3$  interagissent avec l'ADN tandis que les



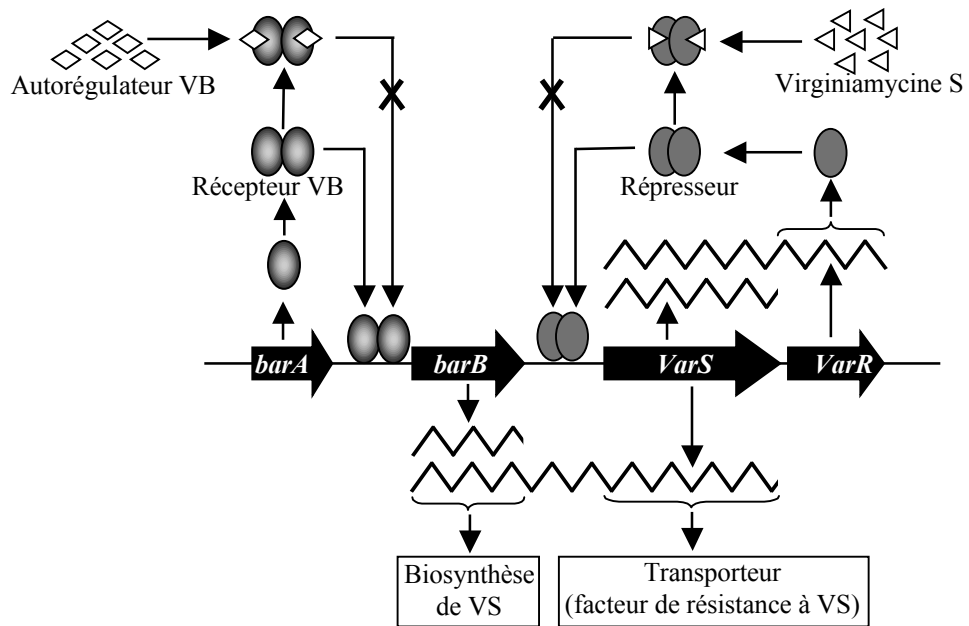
hélices  $\alpha 4$  à  $\alpha 9$  constituent le corps de la protéine. Les motifs HTH de chaque dimère interagissent avec les grands sillons correspondant de l'opérateur et les deux dimères sont situés sur des faces opposées, chacun étant fixé sur une des moitiés de la séquence IR1. En outre, il a été également montré que QacR se fixe de manière coopérative sur son opérateur. De façon surprenante, cette fixation coopérative est « ADN-dépendante », ce qui signifie que l'effet coopératif est régi par un changement de conformation de l'ADN sans contact entre dimères.

#### *Les régulateurs BarR et VarR*

Chez certaines espèces de *Streptomyces*, la production d'antibiotique et/ou la différenciation morphologique sont contrôlées par des composés de faible masse moléculaire appelés auto-régulateurs  $\gamma$ -butyrolactones. Ces auto-régulateurs peuvent être comparés à des hormones puisqu'ils sont efficaces à très faible concentration et que leur signal est transmis dans la cellule via une interaction spécifique avec des récepteurs protéiques cytoplasmiques. Parmi les auto-régulateurs  $\gamma$ -butyrolactones de *Streptomyces virginiae*, on note les virginiae butanolides (VBs) dont le récepteur est la protéine BarA (Kinoshita *et al.*, 1997). La protéine BarA possède, dans sa partie amino-terminale, un motif HTH de fixation à l'ADN. La présence de ce motif HTH permet de rapprocher BarA des répresseurs de la famille TetR.

Le système VB-BarA est activement engagé dans le contrôle de la production de la virginiamycine M1 et de la virginiamycine S (VS), deux antibiotiques structuralement différents qui présentent une activité bactéricide synergique (Nakano *et al.*, 1998). De manière plus précise, il a été mis en évidence que la protéine BarA agit comme répresseur dans la biosynthèse de la virginiamycine et des virginiae butanolides (Nakano *et al.*, 1998) en empêchant la synthèse du transcrite bicistronique *barB-varS* par l'ARNpol (Lee *et al.*, 1999). Le gène *barB* code l'enzyme de biosynthèse de la virginiamycine S tandis que *varS* code la protéine transmembranaire VarS responsable de l'efflux de la virginiamycine S vers l'extérieur de la bactérie, donc de la résistance naturelle de ces bactéries à la virginiamycine S. En absence de virginia butanolide, BarA se fixe sur son opérateur, conduisant à la répression de *barB* et *varS*. En revanche, lorsque la virginia butanolide est produite, celle-ci interagit avec BarA, entraînant la dérégulation de *barB* et *varS*.

Par ailleurs, le produit du gène *varR* situé 89 pb en aval de *varS* possède un motif HTH très conservé et présente une forte homologie avec les répresseurs de la famille TetR. VarR, dimérique *in vitro*, possède une capacité de fixation à la région promotrice de *varS* (Namwat *et al.*, 2001). Cette capacité disparaît lors de l'addition de VS, suggérant que la



**Figure 17** : Mécanisme de régulation transcriptionnelle de l'opéron *varS-varR* par VB et VS (Namwat *et al.*, 2001).

régulation de *varS* est « VS-dépendante ». De plus, *varR* et *varS* sont co-transcrits et VS est un inducteur de la transcription bicistronique. VarR reconnaît un opérateur situé entre le nucléotide -39 et le nucléotide +2 de la région promotrice de *varS* (Namwat *et al.*, 2001).

Selon le modèle de régulation présenté dans la figure 17, la transcription de l'opéron *var* serait réprimée par une petite quantité de VarR avant le démarrage de la production des auto-régulateurs VB – et donc avant la synthèse de la VS. Cette petite quantité de VarR proviendrait du niveau de transcription basal de *varR*. Lorsque VB est produit, l'association VB-BarA conduit au détachement de BarA du promoteur de *barB*, aboutissant ainsi à l'activation de la transcription du bicistron *barB-varS* qui confère la résistance à la virginiamycine S avant l'initiation de la biogenèse de cet antibiotique (Namwat *et al.*, 2001). Lorsque la production de la virginiamycine est entamée, la fixation de VS sur VarR cause la dissociation de VarR de la région promotrice de *varS*, permettant la dérégulation de la transcription de *varS-varR* (Namwat *et al.*, 2001).

#### **VI.4.3.b – Régulateurs contrôlant la production de certaines enzymes du métabolisme : CamR, AguR et McbR**

##### *Régulation du catabolisme du camphre par CamR*

*Pseudomonas putida* PpG1 est un bacille à Gram négatif capable d'utiliser le camphre comme source de carbone. Cette capacité à métaboliser le camphre lui est conférée par la présence d'un plasmide, le plasmide CAM. Les gènes *camD*, *camC*, *camA* et *camB*, sont organisés en un opéron et codent les enzymes nécessaires aux premières étapes du catabolisme du camphre en acide isobutyrique (Koga *et al.*, 1986 ; Koga *et al.*, 1989). Une étude génétique a montré que l'opéron *cam* est contrôlé par le répresseur transcriptionnel CamR, dont le gène est transcrit en sens opposé de l'opéron (Koga *et al.*, 1986). En plus de la régulation transcriptionnelle négative de CamR sur l'opéron *cam*, CamR régule également sa propre expression (Aramaki *et al.*, 1993). CamR est un homodimère de 40 kDa capable de se fixer sur une séquence inversée répétée de 23 pb (Aramaki *et al.*, 1995).

##### *Régulation de l'opéron aguBA par AguR*

*Pseudomonas aeruginosa* PAO1 utilise l'agmatine comme source de carbone et d'azote grâce à deux réactions catalysées successivement par l'agmatine iminohydrolase (ou agmatine déiminase) codée par *aguA* et la N-carbamoylputrescine amidohydrolase codée par *aguB*. Par l'intermédiaire de l'enzyme AguA, l'agmatine est d'abord transformée en

N-carbamoylputrescine qui est par la suite transformée en putrescine par AguB. Après une série de réactions, la putrescine rejoint le cycle de l'acide tricarboxylique sous forme de succinate.

Une séquence nucléotidique de 162 pb sépare l'opéron *aguBA* du gène *aguR* codant une protéine régulatrice de 221 acides aminés (24,4 kDa) de la famille TetR/CamR. L'expression constitutive de l'opéron *aguBA* chez une souche de *Pseudomonas aeruginosa* déficiente pour l'expression du gène *aguR* (Nakada *et al.*, 2001) suggère qu'AguR réprime l'expression de l'opéron *aguBA*. Comme les autres régulateurs de la famille TetR/CamR, le répresseur AguR possède une capacité de fixation à l'ADN. AguR est ainsi capable de se fixer à une séquence palindromique de 16 pb située dans la région promotrice de l'opéron *aguBA* (Nakada *et al.*, 2001).

L'agmatine et la N-carbamoylputrescine provoquent une inhibition spécifique de la fixation de la protéine AguR à son opérateur, suggérant que l'activité de fixation à l'ADN de AguR serait modulée par des concentrations intracellulaires d'agmatine et de N-carbamoylputrescine (Nakada *et al.*, 2001). La fixation de chacun de ces deux composés à AguR (1) abolirait l'interaction entre le régulateur et sa cible opératrice située dans la région promotrice *aguBA* et (2) induirait ainsi la transcription de l'opéron *aguBA*.

#### *McbR, régulateur du réseau de biosynthèse de la méthionine et de la cystéine*

Chez *Corynebacterium glutamicum*, McbR contrôle l'expression de six gènes : *metY*, *metK*, *cysK*, *hom*, *cysI* et *ssuD* dont les produits sont impliqués dans la biosynthèse de la L-méthionine et de la L-cystéine et dans l'utilisation du sulfonate (Rey *et al.*, 2003). La protéine régulatrice McbR contient un motif HTH dans sa région amino-terminale, et cette protéine présente une capacité d'interaction avec la région promotrice du gène *metY* impliqué dans la biosynthèse de la méthionine et de la cystéine (Rey *et al.*, 2003). Contrairement à TetR qui se fixe sur son opérateur en absence de tétracycline, le régulateur McbR perd sa capacité à s'associer à son opérateur en absence de méthionine, conduisant à la dérégulation des gènes impliqués dans la biosynthèse de cette molécule. A l'opposé, la présence de méthionine réprime l'expression des gènes de biosynthèse de cet acide aminé (Rey *et al.*, 2003).

La protéine MetY est une O-acétylhomosérine sulfhydrylase. Cette enzyme catalyse la transformation du sulfide en homocystéine (Hwang *et al.*, 2002). La deuxième protéine MetK, dont la production est contrôlée par McbR, est une S-adénosylméthionine synthase. Le produit S-adénosylméthionine dérive de la méthionine et représente un donneur

ubiquitaire de méthyle ou de méthylène intracellulaire. L'enzyme homosérine déshydrogénase (Hom) catalyse la réaction de réduction NAD-dépendante de l'aspartate-semi-aldéhyde en homosérine, un précurseur direct de la biosynthèse de la méthionine. L'enzyme CysI provoque la réduction du sulfite en sulfide qui est par la suite utilisé dans la biosynthèse de la méthionine. Une autre voie d'utilisation du sulfide est celle qui transite par la cystéine synthase (CysK) et qui conduit à la formation de la L-cystéine. La dernière enzyme contrôlée par McbR a été identifiée comme étant une alcanesulfonate monooxygénase (SsuD). Cette monooxygénase FMNH<sub>2</sub>-dépendante catalyse la dégradation des alcanesulfonates en aldéhydes et en sulfites.

#### VI.4.3.c – Contrôle de la virulence : Mce3R

*mce3* est un des quatre opérons qui codent une famille de protéines exportées chez *M. tuberculosis* et présentant un rôle dans la virulence de cette bactérie. En effet, l'expression des gènes mycobactériens d'invasion *mce* (*mycobacterial cell entry*) conduit à l'internalisation des mycobactéries par les cellules non phagocytaires. Flesselles et ses collègues ont caractérisé en 1999 un mutant de *M. bovis* BCG déficient pour la production des Mce. Ils ont montré que ce mutant *M. bovis* BCG présentait une forte diminution de la capacité des mycobactéries à envahir des cellules épithéliales non phagocytaires (Flesselles *et al.*, 1999). L'analyse du locus *mce3* révèle la présence d'un gène (*Rv1963*) codant un régulateur putatif (Mce3R) de la famille TetR. Mce3R est une protéine de 407 acides aminés (44,3 kDa). La séquence d'acides aminés de cette protéine montre l'existence de deux signatures caractéristiques de la famille TetR, l'une localisée dans la zone amino-terminale (acides aminés 19 à 65) et l'autre, moins conservée, dans la zone carboxy-terminale (acides aminés 223 à 269) (Santangelo *et al.*, 2002). Des expériences génétiques ont permis de mettre en évidence l'effet répresseur de Mce3R sur la transcription du locus *mce3* et une interaction physique directe entre le régulateur Mce3R et la région promotrice de *mce3* a été établie (Santangelo *et al.*, 2002). Toutefois, l'opérateur de Mce3R reste à localiser.

#### VI.4.3.d – PsaA, régulateur du facteur $\sigma^S$ (RpoS)

Le gène *rpoS* code le facteur sigma qui joue le rôle de régulateur central durant la phase stationnaire de croissance chez bon nombre de bactéries à Gram négatif. L'expression du gène *rpoS* répond au signal de la densité cellulaire et conduit à une plus forte expression

de ce gène pendant la phase stationnaire. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, la réponse densité cellulaire-dépendante est corrélée avec la régulation de la transcription du gène *rpoS* (Latifi *et al.*, 1996). Récemment, un mutant de transposition dans le gène *psrA* de *P. putida* a révélé une importante diminution d'activité du promoteur du gène *rpoS* (Kojic *et al.*, 2002).

Le gène *psrA* code une protéine de 26,3 kDa qui contient un motif HTH typique de la famille de régulateurs TetR/CamR. Comme beaucoup d'autres régulateurs de la famille TetR, PsrA réprime sa propre transcription (Kojic *et al.*, 2002). Cependant, ni l'opérateur du régulateur PsrA ni le domaine peptidique précis d'interaction entre le régulateur et l'opérateur n'ont encore été définis.

**CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIFS  
DE LA THESE**

## Contexte scientifique et objectifs de la thèse

Un des aspects clés de la virulence de *M. tuberculosis* réside dans sa capacité à survivre et à se répliquer dans le phagocyte qui constitue, pour la plupart des autres organismes, un environnement extrêmement hostile. La structure particulière de la paroi de cette bactérie à Gram positif est certainement en partie responsable de cette propriété, mais aussi de sa résistance intrinsèque à bon nombre d'antibiotiques.

Quelques uns des agents antimycobactériens les plus efficaces comme l'isoniazide (INH), l'éthambutol, la pyrazinamide et l'éthionamide (ETH), déstabilisent le rempart que constitue la paroi mycobactérienne. Administrés en combinaison, ces antibiotiques présentent des effets additifs délétères pour la bactérie. Ainsi, de manière directe, ils inhibent la synthèse de certaines macromolécules essentielles pour l'intégrité de l'enveloppe bactérienne, entraînant la mort du microorganisme (Chopra & Brennan, 1997). Indirectement ensuite, ils fragilisent les bactéries face aux agressions défensives de l'hôte infecté ou à l'action d'autres antibiotiques moins spécifiques tel que la streptomycine.

L'éthionamide est un analogue structural de l'isoniazide. Ces deux antituberculeux ont pour cible moléculaire commune InhA, une enzyme du système FAS-II impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques. InhA catalyse la réduction NADH-dépendante du 2-*trans*-enoyl-AcpM enrôlé dans l'élongation de la chaîne de méromycolate.

Aujourd'hui, il est établi que l'INH est une pro-drogue activée par la catalase-peroxydase KatG. Cependant, les mycobactéries mutées dans *katG* sont résistantes à l'INH, mais pas à l'éthionamide. Néanmoins, plusieurs données suggèrent que l'ETH aussi est une drogue activable. Ainsi, comme de nombreux thioamides, l'ETH est métabolisé en S-oxyde par des monooxygénases hépatocytaires à flavines. Alternativement, de nombreux mutants mycobactériens résistants à l'ETH générés en laboratoire restent sensibles à l'INH. Cette observation ouvre au moins deux hypothèses de travail : soit il existe des cibles létales qui ne sont pas communes aux deux antibiotiques, soit il existe un processus d'activation de l'ETH différent de celui de l'INH.

En préambule à ce travail, le Docteur Alain Baulard a isolé chez *M. smegmatis* un clone rendu hautement résistant à l'ETH par transformation d'une banque cosmique de *M. tuberculosis* mais qui par contre était resté sensible à l'INH. La zone moléculaire minimale induisant la résistance à l'ETH a été définie par mutagenèse transpositionnelle du cosmide. Une seule phase ouverte de lecture s'est avérée contenir l'information nécessaire et suffisante à l'obtention de clones de *M. smegmatis* et de *M. bovis* BCG résistants à l'ETH.



La recherche informatique d'homologue de la protéine correspondante a rapidement permis de classer le gène *Rv3855 (ethR)* responsable du phénotype de résistance à l'ETH dans la famille des régulateurs transcriptionnels de la famille TetR/CamR. A ce stade de la recherche, 3 objectifs majeurs ont été fixés.

Le premier objectif était de comprendre comment la surexpression d'un régulateur transcriptionnel peut provoquer la résistance à un antibiotique inhibant la synthèse des mycolates de la paroi mycobactérienne.

Ce résultat a été confronté aux deux hypothèses de travail présentées ci-avant.

La résistance à l'ETH par surexpression de *ethR* peut s'expliquer par :

- une régulation transcriptionnelle positive d'un gène dont le produit est une cible de l'ETH ou,
- une régulation négative d'un gène impliqué dans la bioactivation de l'antibiotique.

La première partie du travail nous a permis de discriminer entre ces deux hypothèses et a mené à l'identification de *ethA*, le gène cible de la régulation négative par EthR.

*M. tuberculosis* possède plus de 100 régulateurs transcriptionnels (Cole *et al.*, 1998) et très peu ont été caractérisés à ce jour. D'autre part, aucun membre de la famille TetR/CamR n'a été étudié chez *M. tuberculosis*. Le deuxième objectif de cette thèse a donc consisté en la caractérisation moléculaire des mécanismes de régulation par EthR.

Enfin, la compréhension fine des mécanismes moléculaires de régulation passe par l'élucidation de la structure quaternaire des complexes de régulation. Les questions posées au cours de ce travail seront abordées dans le but de faciliter l'analyse structurale en préparant le matériel nécessaire à l'élucidation du complexe de régulation formé par EthR et sa cible.

L'objectif ultime de cette étude est d'une part d'essayer de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à la résistance à l'ETH afin de combattre plus efficacement l'apparition de souches résistantes. D'autre part, ce travail pourrait déboucher sur la mise au point de drogues plus efficaces et moins toxiques, dérivant d'ETH ou non.

# **RESULTATS**

## **CHAPITRE 1**

## ***Régulation de l'activation de la pro-drogue ethionamide chez les mycobactéries***

Article 1 : *Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria*

Alain R. Baulard, Joanna C. Betts, Jean Engohang-Ndong, Selwyn Quan, Ruth A. McAdam, Patrick J. Brennan, Camille Locht and Gyardyal S. Besra.

Dans l'exposé bibliographique, nous avons vu que l'ETH est un analogue structural de l'INH et que ces deux antimycobactériens sont de puissants inhibiteurs de la biosynthèse des acides mycoliques. Des mutations, au sein du promoteur ou dans la phase ouverte de lecture du gène codant l'énoyl-ACP réductase *InhA*, génèrent des mycobactéries résistantes aux deux antituberculeux, suggérant que l'ETH et l'INH ont au moins cette cible en commun. Toutefois, une importante différence entre ces deux antimycobactériens réside dans l'absence de résistance croisée systématique observée chez de nombreux isolats cliniques de *M. tuberculosis*. Cette différence pourrait être attribuée au fait que l'INH est une pro-drogue activée par la catalase-peroxydase mycobactérienne codée par le gène *katG*, alors que *KatG* n'a aucun effet sur l'action de l'ETH. En effet, des mutants incapables de produire *KatG*, et donc résistants à l'INH, restent cependant sensibles à l'ETH. Ainsi, si comme l'INH, l'ETH est une pro-drogue, celui-ci est transformé en sa forme mycobactéricide par un facteur autre que *KatG*. Appuyant cette hypothèse, il a été montré que les thioamides, famille de composés à laquelle appartient l'ETH sont bioactivables par des monooxygénases hépatiques à FAD, ce qui souligne la réactivité chimique de cette famille. Un des objectifs de la publication présentée ci-après fut d'identifier les gènes potentiellement impliqués dans ce processus d'activation.

L'analyse d'une banque génomique de *M. tuberculosis* H37Rv nous a permis d'identifier le gène *Rv3855* dont la surexpression conduit à un phénotype d'hyperrésistance à l'ETH aussi bien chez *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155, chez *M. bovis* BCG 1173P2 que chez *M. tuberculosis* H37Rv. Inversement, l'interruption chromosomique par mutagenèse transpositionnelle du gène *Rv3855* conduit à un phénotype d'hypersensibilité à l'ETH chez *M. bovis* BCG.

*Rv3855* code une protéine (216 acides aminés) de 23,7 kDa. L'analyse *in silico* de la séquence d'acides aminés de la protéine révèle, dans sa région amino-terminale un motif

HTH clairement apparenté à celui des régulateurs de la famille TetR/CamR. Rv3855 a donc été baptisé EthR.

L'analyse de la région chromosomique environnant EthR révèle la présence d'un gène de 1467 pb (*Rv3854c*), séparé de seulement 74 pb de *ethR*, et dont la transcription est prédite en sens opposé à ce dernier. Le gène *Rv3854c* code une protéine potentielle de 489 acides aminés, soit une masse moléculaire de 55,3 kDa. L'étude *in silico* de *Rv3854c* indique que cette protéine possède des signatures propres aux membres de la famille des monooxygénases à FAD.

L'implication de *Rv3854c* dans l'activation de l'ETH a été étudiée en surexprimant le gène *Rv3854c* chez *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 et *M. bovis* BCG 1173P2.

Les souches surexprimant *Rv3854c* présentent un phénotype d'hypersensibilité à l'ETH, corrélé à une forte inhibition de la biosynthèse des acides mycoliques à des concentrations d'ETH 10 fois plus faibles que les concentrations minimales inhibitrices normales. Ces résultats suggèrent que *Rv3854c* (baptisé *ethA*) participe à la bioactivation de l'ETH, jouant ainsi un rôle équivalent à celui de *katG* pour l'INH.

Au cours de ce travail, nous avons montré qu'un mutant *M. bovis* BCG déficient pour la production de EthR génère des clones hypersensibles à l'ETH. Le phénotype de ce mutant est identique à celui observé chez les mycobactéries surexprimant *ethA*. A l'opposé, les mycobactéries surexprimant *ethR* présentent un phénotype d'hyperrésistance à l'antibiotique. Associées aux analyses *in silico* d'EthR, ces données suggèrent que EthR pourrait contrôler l'expression de *ethA*.

La démonstration de cette hypothèse fait l'objet du travail décrit dans le chapitre suivant.

## Activation of the Pro-drug Ethionamide Is Regulated in Mycobacteria\*

Received for publication, May 3, 2000, and in revised form, June 20, 2000  
Published, JBC Papers in Press, June 26, 2000, DOI 10.1074/jbc.M003744200

Alain R. Baulard<sup>‡</sup>, Joanna C. Betts<sup>§</sup>, Jean Engohang-Ndong<sup>‡</sup>, Selwyn Quan<sup>§</sup>, Ruth A. McAdam<sup>§</sup>,  
Patrick J. Brennan<sup>¶</sup>, Camille Locht<sup>‡</sup>, and Gurdyal S. Besra<sup>||\*\*</sup>

From <sup>‡</sup>INSERM U447, Institut de Biologie de Lille, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille, France, <sup>§</sup>Glaxo Wellcome, Research and Development, Stevenage SG1 2NY, England, the <sup>¶</sup>Department of Microbiology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523-1677, and the <sup>||</sup>Department of Microbiology & Immunology, University of Newcastle upon Tyne, Newcastle upon Tyne NE2 4HH, England

The anti-tuberculosis drug ethionamide (ETH), which is a structural analog of isoniazid (INH), is known to strongly inhibit mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. Although several targets have been identified for INH, only speculative information is available concerning ETH. Mutations within the promoter and the coding region of enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA) were found to confer resistance to both drugs, thus leading to the impression that INH and ETH may share a common mode of action. However, a notable distinction between the two drugs lies in the lack of cross-resistance in clinical isolates. This may be attributed in part to the fact that the pro-drug INH must be activated via KatG, and no activation step for ETH has yet been described. Here we report the identification of an activator for ETH. The ETH activator (*Rv3854c*), which we have termed EthA, was found to be homologous to various monooxygenases and induced ETH sensitivity when overexpressed in mycobacteria. Interestingly, the neighboring open reading frame (*Rv3855*), which was found homologous to transcriptional repressors of the *tetR* family, led to ETH resistance when overexpressed. In addition, chromosomal inactivation of this gene by transposition led to ETH hypersensitivity. These data strongly suggest that *Rv3855*, which we have termed EthR, regulates the production of EthA, which subsequently activates the pro-drug ETH. This study opens up new avenues of research relating to ETH activation in mycobacteria, possibly leading to an improved efficacy of ETH and to the generation of new anti-mycobacterial agents.

The treatment of tuberculosis involves extremely lengthy and specialized chemotherapy regimens (1). The molecular composition and structural features of the mycobacterial cell

envelope are thought to confer low permeability and thereby a basal resistance to most hydrophilic drugs (2). As a consequence, the lack of potency and protracted duration of drug administration are a major cause of rampant mutational drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* (3). An essential step in developing novel therapies for the treatment of *M. tuberculosis* infections is to determine why multidrug-resistant strains of *M. tuberculosis* are resistant to many existing anti-mycobacterial agents. Possible mechanisms of resistance include: alteration of the target enzyme that has become resistant to antibiotics; increased expression of the gene encoding the target enzyme; mutations causing impermeability of the mycobacterial cell to the antibiotic; and/or alterations of an activation mechanism. Thus, the urgent need to develop new therapies for treating *M. tuberculosis* infections requires the definition of the failures of existing treatments and the discovery of new drug targets.

The bacterial cell wall has been an effective target for many drugs (4). Many anti-tuberculosis agents, including ethambutol, cycloserine, isoniazid (INH),<sup>1</sup> ethionamide (ETH), thiocarlide, and the thiosemicarbazones are known to inhibit cell wall biosynthesis. INH (see Fig. 1), which is one of the most efficient and the most widely used anti-tuberculosis drugs, has been the subject of intensive research during the past decade (5–7). Both *M. tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG are extremely susceptible to INH (minimum inhibitory concentrations (MIC), 0.02–0.2 µg/ml), and earlier evidence suggested that INH specifically inhibits the synthesis of mycolic acids in *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG (8–11). ETH (see Fig. 1), a structural analog of INH, is a useful second line anti-tuberculosis drug. The two drugs have almost identical effects in that both strongly inhibit the synthesis of mycolic acids (12, 13). Banerjee and colleagues (14) demonstrated that a single mutation in the *inhA* gene (NADH-specific, 2-*trans*-enoyl-acyl carrier protein reductase) confers resistance to INH and ETH, leading to the impression that the mode of action of both drugs is identical. In addition, mutations within *katG*, encoding a catalase-peroxidase led to the majority of INH-resistant isolates (6), demonstrating that INH is a pro-drug and that an activated metabolite is responsible for its mode of action (15, 16). However, the notable distinction between the actions of ETH and INH resides in the lack of cross-resistance (4, 17). The majority of

\* This work was supported in part by the Institut Pasteur de Lille, INSERM, by the Alliance Joint Research Programme from the Ministère des Affaires Étrangères in France and the British Council, by The Medical Research Council (UK), by Glaxo Wellcome Research & Development (UK), by Grants AI-18357 and AI-33706 from the NIAID, National Institutes of Health (NIH), and by Grant AI-38087 from the National Cooperative Drug Discovery Groups for the Treatment of Opportunistic Infections, NIAID, NIH. Genomic DNA was provided by the NIAID, NIH, Tuberculosis Research Materials and Vaccine Testing Contract NO1-AI-75320. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

\*\* A Lister Institute-Jenner Research Fellow. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 0191-222-5412; Fax: 0191-222-7736; E-mail: g.s.besra@newcastle.ac.uk.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: INH, isoniazid; ETH, ethionamide; ETH<sup>R</sup>, ETH-resistant; ETH<sup>S</sup>, ETH-susceptible; FAME, fatty acid methyl ester; MAME, mycolic acid methyl ester; TLC, Thin layer chromatography; ORF, open reading frame; TBAH, tetrabutylammonium hydroxide; *hyg*, hygromycin resistance gene; PCR, polymerase chain reaction; kb, kilobase(s); bp, base pair(s); MIC, minimum inhibitory concentration; BCG, bacillus of Calmette-Guérin.

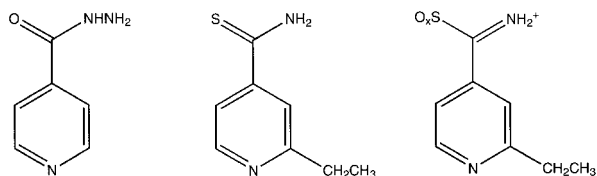


FIG. 1. Structures of INH, ETH, and ETH S-Oxide.

strains resistant to ETH are sensitive to INH, whereas some strains resistant to INH show slightly increased sensitivity to ETH (18). Thus, there are subtle discrepancies between biochemical and genetic information on the modes of sensitivity and resistance in the cases of INH and ETH.

Because INH requires activation via KatG, it is tempting to postulate an activation process for ETH. Inactivation of such an ETH-specific process could account for the lack of cross-resistance between the two drugs. Interestingly, ETH undergoes oxidation by rat liver microsomes to generate a highly reactive S-oxide, possibly a sulfinate (Fig. 1) that exhibits greater activity *in vitro* against *M. tuberculosis* than ETH itself (19–21). These observations, in addition to the fact that genetic alterations in *katG* do not confer resistance to ETH, have led us to the hypothesis that ETH needs to be activated through a KatG-independent mechanism.

In this report, we describe the cloning and characterization of the gene *Rv3855*, which we now term *ethR*, that confers resistance to ETH, but not to INH when it is overexpressed in either *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG, or *M. tuberculosis* on a multicopy vector. Furthermore, a transposon mutant of *ethR* leads to ETH hypersensitivity in *M. bovis* BCG. In addition, genetic and biochemical evidence suggests that *ethR* encodes a transcriptional regulator that is not directly implicated in mycolic acid biosynthesis but plays an important role in the regulation of a second open reading frame (ORF), which is responsible for the activation of ETH. Analysis of the locus surrounding *ethR* revealed the presence of an adjacent gene now termed *ethA*, which encodes a putative monooxygenase, the predicted activator of ETH. Overexpression of *ethA* led to hypersensitivity to ETH in mycobacteria. Thus, the data presented are compatible with the notion that *ethR* represses *ethA*, which encodes the equivalent protein of KatG implicated in the activation of ETH.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Bacterial Strains and Growth Conditions**—*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, *M. bovis* BCG 1173P2 (WHO, Stockholm, Sweden), and *M. tuberculosis* H37Ra and their transformants were grown on 7H11 agar supplemented with oleic-albumin-dextrose-catalase enrichment (Difco, Detroit, MI) or on Sauton medium (22) supplemented with 0.001% ZnSO<sub>4</sub> and 0.25% Triton WR1339 (Sigma). *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 is an electroporation-efficient mutant of mc<sup>2</sup>6 (23). *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG, and *M. tuberculosis* were transformed as described previously (24). Large scale cultures of mycobacteria were grown to mid-log phase (*M. bovis* BCG, 10–14 days; *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, 36 h; *M. tuberculosis* H37Ra, 12–16 days), harvested, washed with phosphate-buffered saline and stored at –20 °C until further use. *Escherichia coli* strains XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA), NK5587, and their transformants were grown in Luria-Bertoni (LB) broth (Life Technologies, Inc.) and agar medium. *E. coli* SH305 was grown in 2YT (25) supplemented with 1% glucose. All strains were incubated at 37 °C. Antibiotics (Sigma) were added to media at the following concentrations: kanamycin at 20 µg/ml, tetracycline at 10 µg/ml, chloramphenicol at 100 µg/ml, and ampicillin at 100 µg/ml.

**Plasmids and DNA Manipulation**—The *E. coli*-mycobacterial shuttle vector pMV261 containing the *hsp60* promoter was used as described previously (26). Restriction enzymes and T4 DNA ligase were purchased from Roche Molecular Biochemicals (Mannheim, Germany), and Vent DNA polymerase was purchased from New England Biolabs. All DNA manipulations were performed using standard protocols, as described by Sambrook *et al.* (25).

**Identification of pETH80 and Transposon  $\gamma\delta$  Mutagenesis of pETH80 in *E. coli***—A genomic library of *M. tuberculosis* H37Rv, constructed by cloning 35- to 40-kb *Sau*3AI fragments of chromosomal DNA into the shuttle cosmid pYUB18 (27), was the source of cosmid pETH80 conferring ETH resistance to *M. smegmatis*. The minimal region of pETH80 involved in ETH resistance was identified by  $\gamma\delta$  transposition in *E. coli* as described by Guyer (28). Briefly, a suitable *E. coli* donor strain NK5587 (F' *lacY*::Tn9) was transformed with pETH80. One isolated transformant was subsequently conjugated with *E. coli* SH305 (*recA1 srl*::Tn10) with selection for kanamycin-resistant/tetracycline-resistant exconjugants. Plasmid DNA was extracted from 50 double resistant exconjugants, retransformed into *M. smegmatis*, and scored for their ETH<sup>R</sup> phenotype. Tn1000 ( $\gamma\delta$ ) insertions were localized by restriction mapping and sequencing using primers near the end of  $\gamma\delta$  (primer  $\gamma\delta$ 1: 5'-CAACGAATTATCTCCTT-3'; primer  $\gamma\delta$ 2: 5'-TCAATAAGTTATACAT-3').

**Cloning and Expression of *Rv3855* and *Rv3854c***—*Rv3855* was cloned into the mycobacterial overexpression vector pMV261 as follows. PCR amplification was performed using the upstream primer 142: 5'-CCACCTCCGGCGCCAGTCAGG-3' and the downstream primer 141: 5'-TTTGGCACTGAGAATTCACCGAGCACCC-3', which contains an *Eco*RI restriction site (*underlined*). The 690-bp PCR product was digested with *Eco*RI and cloned into *Mlu*NI/*Eco*RI-restricted pMV261, giving rise to pMV261-*ethR*, where *ethR* is fused in-frame with the ATG initiation codon of *hsp60*. A similar strategy was used to construct the pMV261-based expression vector for *Rv3854c*. *Rv3854c* was amplified by PCR using the upstream primer 150: 5'-AGCACCTCGACGTTGTTCATC-3' and the downstream primer 149: 5'-ACGGATCCCCGCAAGAGCACCA-3', which contains a *Bam*HI restriction site (*underlined*). The 1624-bp fragment was digested by *Bam*HI and cloned into *Mlu*NI/*Bam*HI-restricted pMV261, generating pMV261-*ethA*. The coding sequences of all amplified genes were verified by DNA sequencing after their cloning in pMV261.

**Determination of the *in Vivo* Effects of ETH and INH on Fatty Acid and Mycolic Acid Synthesis in Mycobacteria**—*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, *M. bovis* BCG, and *M. tuberculosis* were grown to mid-log phase ( $A_{600} \sim 0.3$ ). ETH or INH were added at various concentrations followed by further incubation for 4 h (for *M. smegmatis*) or 24 h (for *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*). At this point, 1,2-[<sup>14</sup>C]acetate (1 µCi/ml) (Amersham Pharmacia Biotech) was added and the cultures were further incubated with gentle agitation at 37 °C for 4 h (for *M. smegmatis*) or 24 h (for *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*). The resulting <sup>14</sup>C-labeled cells from ETH- or INH-treated cultures were harvested, washed twice with phosphate-buffered saline, resuspended into 3 ml of 15% tetrabutylammonium hydroxide (TBAH), and saponified at 100 °C for 15 h. After cooling, dichloromethane (4 ml), water (2 ml), and iodomethane (300 µl) were added, and the entire reaction mixture was agitated for 30 min. After centrifugation, the upper, aqueous phase was discarded and the lower, organic phase was washed twice with water, dried in a sand bath, and extracted twice with diethyl ether (3 ml) and the ethereal extracts were dried and resuspended into 500 µl of dichloromethane for radioactivity counting. Equal volumes of this extract, which is composed of fatty acid methyl esters (FAMES) and mycolic acid methyl esters (MAMEs), were separated by thin-layer chromatography (TLC) on silica gel (Merck 5735 Silica Gel 60 F<sub>254</sub>, Darmstadt, Germany) and developed once in petroleum ether:acetone (95:5, v/v). Subsequent autoradiography revealed <sup>14</sup>C-labeled fatty acid and mycolic acid methyl esters after overnight exposure of the TLC plates to Kodak BioMax MR film.

**Characterization of the *M. bovis* BCG Transposon Insertions**—Genomic DNA (200–500 ng) of the mutagenized clones was digested with *Rsa*I (New England Biolabs). After heat inactivation of the restriction enzyme at 65 °C for 20 min, the digested DNA (40–100 ng) was ligated with T4 DNA ligase (New England Biolabs) at room temperature. PCR reactions were carried out in a total volume of 25 µl containing Amplitaq PCR buffer (Perkin-Elmer), 10% (v/v) dimethyl sulfoxide, 0.25 µM dNTPs, 0.4 µM 84L-F (5'-GTCATCCGGCTCATCACCAG-3'), and 0.4 µM 84L-R (5'-AACTGGCGCAGTTCCTCGG-3') primers, 4–10 ng of template DNA, and 0.5 unit of Amplitaq Gold (Perkin-Elmer). Thermal cycling was performed in a Perkin-Elmer 9600 machine with an initial denaturation at 94 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 94 °C for 30 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 90 s, and a final extension of 72 °C for 7 min.

#### RESULTS

**Identification of Cosmids Conferring ETH Resistance in *M. smegmatis***—The chromosomal region involved in ETH resist-

ance was sought using drug resistance imparted via gene overexpression by a plasmid vector, as a selection tool. A genomic library of DNA from *M. tuberculosis* H37Rv was screened using the ETH<sup>S</sup> (MIC of 15 µg/ml) *M. smegmatis* host strain mc<sup>2</sup>155 for clones that exhibited an ETH<sup>R</sup> phenotype. Electrotransformants were plated in duplicate on medium containing kanamycin with ETH at 80 µg/ml. Colonies were scored as ETH<sup>R</sup> if growth appeared on plates after 4 days of incubation at 37 °C. Single ETH<sup>R</sup> colonies were re-streaked onto duplicate 7H10/oleic-albumin-dextrose-catalase plates containing kanamycin and INH (5 µg/ml). Specific ETH<sup>R</sup> clones were selected that grew in the presence of ETH but remained fully sensitive to INH. The cosmids, which confer ETH<sup>R</sup>, were recovered from the *M. smegmatis* transformants by electroduction into *E. coli* (29). Following analysis, all clones were found to contain the same cosmid (pETH80), which corresponded to a minimum of two chromosomal regions, probably associated during the packaging process (data not shown).

**Identification by Transposon  $\gamma\delta$  (Tn1000) Mutagenesis of the Minimal Region of pETH80 Responsible for ETH Resistance**—The minimal region required for ETH resistance in *M. smegmatis* was determined by transposon mutagenesis of pETH80. The method, adapted from Guyer *et al.* (28) is based on the transposition in *E. coli* of  $\gamma\delta$  during F-mediated conjugal mobilization. Briefly, the mutagenesis technique is based upon the observation that conjugal transmission of pBR322 by the conjugative plasmid F is dependent on, or at least completely correlated with, the transposition of  $\gamma\delta$  from F to pBR322 (28). The transposition of  $\gamma\delta$  has also proved efficient on plasmids other than pBR322 (30). The cosmid pETH80 identified in this study is an *E. coli*-mycobacterial shuttle vector based on ColE1 origin of replication. Thus, the mapping process of the minimal region of pETH80 responsible for ETH<sup>R</sup> in mycobacteria was achieved in two steps. First, mutagenesis of pETH80 in *E. coli* before the re-introduction of the derivatized DNA into mycobacteria allowed the analysis of insertion mutations. Of the 50 clones analyzed, 38  $\gamma\delta$  insertions were located in the inserted portion of pETH80. Three  $\gamma\delta$  insertions were able to abolish ETH<sup>R</sup> in *M. smegmatis*. Restriction analysis of these clones revealed that these  $\gamma\delta$  insertions were located within 0.6 kb of DNA. Sequencing of the regions located left and right of  $\gamma\delta$  (with primers  $\gamma\delta$ 1 and  $\gamma\delta$ 2) revealed that all three insertions disrupted the same ORF annotated *Rv3855* in the *M. tuberculosis* H37Rv genome data base, which was thus termed *ethR*.

**Cloning and Overexpression of *ethR* (*Rv3855*) in Mycobacteria**—To avoid possible interference of other ORFs of pETH80 in association with ETH<sup>R</sup>, the coding region of *ethR* was amplified by PCR and cloned in-frame with *hsp60* into pMV261. The resultant plasmid pMV261-*ethR* was transformed into *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG, and *M. tuberculosis*, and the MICs of the transformed bacteria were compared with those of untransformed strains and with those of strains containing the original pETH80. The MICs were determined by plating serial dilutions onto medium containing kanamycin plus 0–200 µg/ml ETH in increments of 10 µg/ml or 0–10 µg/ml INH in increments of 1 µg/ml. The MIC was defined as the lowest concentration of ETH that inhibited the growth of 99% of the bacteria. Table I summarizes the results obtained, suggesting a direct correlation between the level of expression of *ethR* and ETH resistance. All three mycobacterial species transformed with pMV261-*ethR* remained sensitive to INH, thus demonstrating that overexpression of *ethR* specifically induces ETH resistance. In parallel, susceptibility assays with isoxyl, thiolactomycin, erythromycin, crystal violet, and streptomycin indicated that resistance was specific for ETH.

*Selective Effects of ETH on Inhibition of Mycolic Acid Syn-*

TABLE I  
MICs (µg/ml) of ETH for mycobacteria harbouring *ethR*, *ethA*, or *ethR* KO

	pMV261	pETH80	pMV261- <i>ethR</i>	pMV261- <i>ethA</i>	<i>ethR::hyg</i>
<i>M. smegmatis</i> <sup>a</sup>	15	80	250	<1	NT <sup>b</sup>
<i>M. bovis</i> BCG <sup>c</sup>	2	25	35	NT	<0.6 <sup>d</sup>
<i>M. tuberculosis</i> <sup>e</sup>	1	20	30	NT	NT

<sup>a</sup> Strain mc<sup>2</sup>155.

<sup>b</sup> NT, not tested.

<sup>c</sup> Strain Paris 1173P2, except in column 5.

<sup>d</sup> Strain NCTC 5692.

<sup>e</sup> Strain H37Ra.

*thesis*—Untransformed and pMV261-*ethR*-transformed *M. bovis* BCG were grown in the presence or absence of ETH at various concentrations, after which cultures were labeled with 1,2-[<sup>14</sup>C]acetate. Combined MAMEs and FAMEs were extracted, resolved, and fractionated on TLC plates. Untransformed *M. bovis* BCG exhibited a clear decrease in the incorporation of radioactivity into MAMEs in the presence of ETH (from 0 to 100 µg/ml) (Fig. 2). Examination of the individual classes of mycolates revealed that the production of all species was specifically inhibited. In addition, the production of a yet to be described and identified product, possibly a mycolate-specific fatty acid precursor, was progressively inhibited after treatment with ETH (and with INH) (Fig. 3). The characterization of this product may be crucial for the identification of the specific target for ETH, but has been hampered by its relatively low abundance in the mycobacterial cell wall. In contrast, treatment of *M. bovis* BCG (pMV261-*ethR*) with ETH (0–100 µg/ml) had no dramatic effect on the synthesis of MAMEs and FAMEs (Fig. 2). Possible mechanisms related to ETH resistance may include detoxification of the drug or repression of an activation process of ETH leading to its active metabolite, conceivably an *S*-oxide type derivative (19). The latter seemed an attractive scenario, because EthR is homologous to bacterial regulatory proteins of the TetR family (see Fig. 4B). Many of the proteins of the TetR family are repressors. As for EthR (23.725 kDa), they all have similar molecular masses, from 21 to 25 kDa. The most conserved region between EthR and the TetR family members is characterized by a helix-turn-helix motif located in the N-terminal third of the protein. As illustrated in Fig. 4A, the signature pattern (PS01081) starts four residues before the helix-turn-helix motif and ends six residues after the motif.

**Construction of an *M. bovis* BCG *ethR* Knock Out Mutant**—Mutagenesis of *M. bovis* BCG NCTC 5692 was performed as described previously using the mycobacteriophage mini-transposon delivery system pJSC84 (31).<sup>2</sup> Individual mutants were isolated, and the transposon insertions were characterized by inverse PCR. A clone with a transposon insertion between nucleotides 4,327,971 and 4,327,972 in the *M. bovis* BCG genome was identified (Fig. 5). The insertion disrupted *ethR* between nucleotide positions 426 and 427, leading to the production of a truncated polypeptide of 142 amino acids (instead of 648 for the normal protein). The *M. bovis* BCG *ethR::hyg* strain was found to be extremely sensitive to ETH, with an MIC < 0.6 µg/ml (see Table I). The MIC for INH remained identical for *M. bovis* BCG and *M. bovis* BCG *ethR::hyg*, confirming that *ethR* was specific for ETH resistance.

**Inhibition of Mycolic Acid Synthesis in *M. bovis* BCG (pMV261-*ethR*)**—The isolated *M. bovis* BCG *ethR::hyg* clone was grown in the presence or absence of ETH and examined for the relative inhibition of mycolic acid synthesis. Concentrations as low as 2.5 µg/ml ETH completely abolished mycolic

<sup>2</sup> J. Cox, unpublished results.



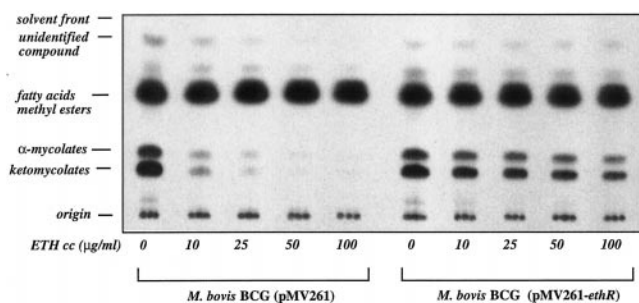


FIG. 2. The dose-response effects of ETH on fatty acid and mycolic acid synthesis in *M. bovis* BCG (pMV261) and *M. bovis* BCG (pMV261-*ethR*). The inhibitory effect on the incorporation of 1,2- $^{14}\text{C}$ acetate was assayed by labeling in the presence of increasing concentrations of ETH and terminated by addition of 15% TBAH at 100 °C overnight. The corresponding FAMEs and MAMEs were isolated, spotted on aluminum-backed TLC plates, which were developed once in petroleum ether:acetone (95:5, v/v), and exposed overnight to a Kodak BioMax MR film.

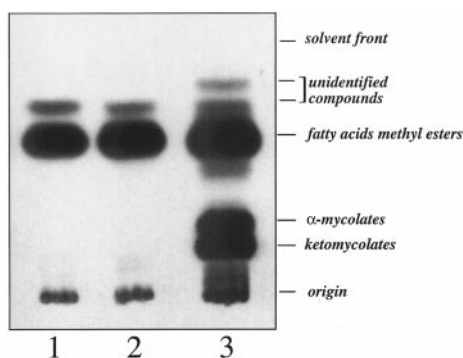


FIG. 3. Effect of INH and ETH on fatty acid and mycolic acid synthesis. The samples are FAMEs and MAMEs from *M. bovis* BCG + ETH 40 µg/ml (lane 1), *M. bovis* BCG + INH 10 µg/ml (lane 2), and *M. bovis* BCG (lane 3).

acid synthesis in comparison to 50 µg/ml for the wild-type *M. bovis* BCG strain (Fig. 6). This supported our hypothesis that *ethR* is involved in the repression of the formation of the active metabolite of ETH. Interestingly, in the absence of ETH, the FAME and MAME profiles of the mutant were unaffected, confirming the notion that *ethR* is not directly implicated in mycolic acid synthesis, but may rather be related to ETH activation.

**Identification of the Gene Encoding the Putative ETH Activator**—It is not unusual to find a gene under the control of a transcriptional regulator encoded by the neighboring ORF. The intergenic region located between *Rv3854c* and *Rv3855* (*ethR*) is 76 bp long, and the two genes are transcribed in opposite directions. This situation is consistent with the presence of divergent promoters in this region (32). For some regions of divergent transcription described so far, one transcript determines a regulatory molecule and the other determines a non-regulatory polypeptide. The regulatory molecule may act within the divergent transcript unit to control transcription of the non-regulatory polypeptides; often it also regulates its own synthesis (32). Interestingly, *Rv3854c*, the adjacent ORF to *ethR*, is homologous to various monooxygenases (Fig. 4C). Thus, *Rv3854c* could be a candidate to play a role equivalent to eukaryotic monooxygenases in the generation of active metabolites of ETH, notably *S*-oxides (20, 21). To test this hypothesis, *Rv3854c* was overexpressed in *M. smegmatis* (pMV261-*ethA*) and the recombinant strain was examined for ETH sensitivity. As anticipated, *M. smegmatis* (pMV261-*ethA*) was hypersensitive to ETH (Table I), and a dramatic inhibition of mycolic acid synthesis was observed at very low concentrations of ETH in

comparison to wild-type *M. smegmatis* (Fig. 7). These results strongly suggest that *Rv3854c*, which we have now termed *ethA*, plays a role equivalent to *katG* for INH, but in relation to ETH.

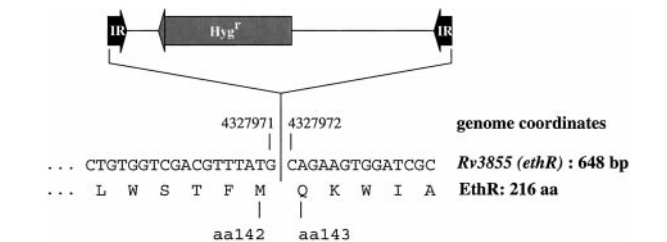
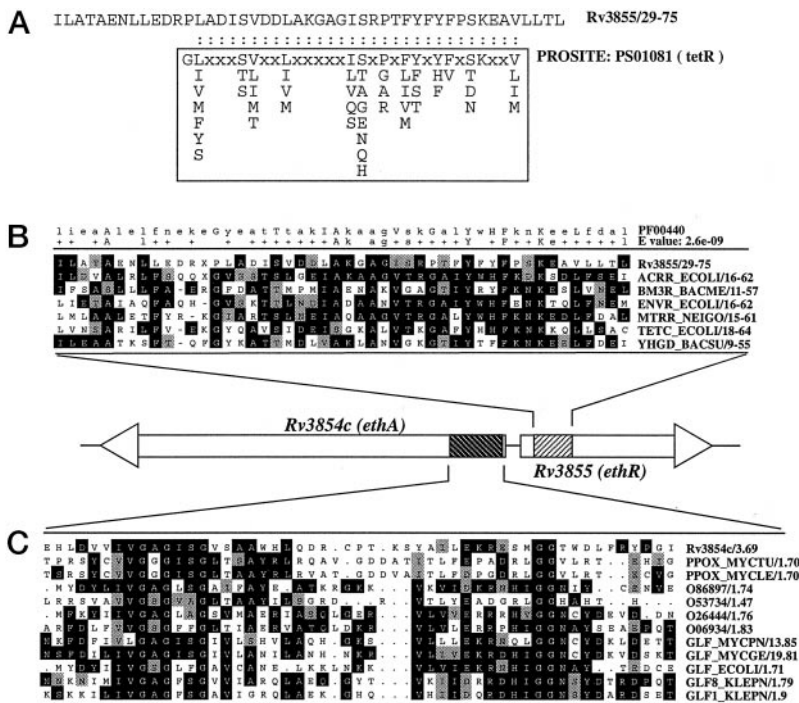
## DISCUSSION

INH and ETH are specific anti-tuberculosis drugs, which inhibit mycolic acid synthesis through *InhA* as suggested by resistance to both ETH and INH of an *inhA* mutant (14). Moreover, by the use of microarray hybridization, Wilson and coworkers (33) recently demonstrated that ETH treatment of *M. tuberculosis* induced the same genes that were induced by INH. However, Fattorini and coworkers (17) recently reported that of 46 INH-resistant strains of *M. tuberculosis* isolated from Italian patients only two were also ETH-resistant. Before INH exerts its lethal effect it must be converted to an active form, possibly an isonicotinic acyl anion (34) or an isonicotinic acyl radical (35) produced by the catalase-peroxidase *KatG*. ETH and other thioamides are sulfur-containing compounds, which are known to be substrates for oxidative catalysts, such as flavin-containing monooxygenases and cytochrome P-450 monooxygenases. An NADPH-dependent oxidation of ETH has previously been demonstrated in rat microsomes (20). More recently, Johnsson *et al.* (34) suggested that *in vitro* oxidation of ETH produces electrophilic intermediates (*S*-oxides) capable of undergoing addition reactions to nucleophilic protein side chains (35). During the 1950s ETH and, subsequently, prothionamide were introduced in the treatment of tuberculosis and were deemed clinically as effective as dapson in the treatment of leprosy (36). However, 25% of the patients suffered from various gastrointestinal symptoms and sometimes jaundice, especially when ETH was combined with rifampicin (37). The hepatotoxicity induced by administration of ETH and thionicotinamide was decreased by preadministration of methimazole. Preadministration of methimazole was also shown to decrease the levels of excretion of thionicotinamide *S*-oxide, indicating that thioamide *S*-oxidation, mediated by the flavin-containing monooxygenases, may be linked to the initiation of hepatotoxicity induced by these thioamides (38).

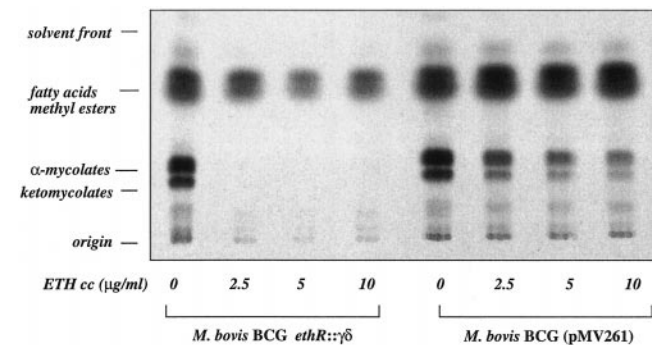
Here we describe evidence that ETH is activated by the monooxygenase homolog *Rv3854c* (*EthA*). *EthA* would then be the equivalent of *KatG* for INH. Thus, in a similar fashion by which mutations in *katG* abolish INH sensitivity without leading to ETH resistance, we would expect that mutations in *ethA* lead to ETH resistance without affecting INH sensitivity. Studies are currently in progress examining clinical isolates for point mutations within *ethA*. Overexpression of *ethA* led to a dramatic increase in ETH sensitivity of *M. smegmatis* and clearly indicated that only a small proportion of ETH is activated when mycobacterial cells are grown under laboratory conditions. Alternatively, when administered to humans, ETH may be activated by either eukaryotic oxidative processes as mentioned earlier or by *EthA* (or perhaps a combination of both). Thus, determining the respective contribution of the bacterial and the eukaryotic activation of thioamides to their ultimate necrogenic forms would be crucial to understand the impact of *EthA* on the efficacy of ETH *in vivo* and to help designing new improved versions of ETH.

ETH resistance may also be mediated by the overproduction of the putative repressor *EthR*. As a regulator, it is logical to assume that the production of *EthR* is also regulated, perhaps by signals external to the bacteria. Thus, any agent able to block *EthR*, or any physiological condition down-regulating *ethR* may favor the production of *EthA* and lead to the activation of substantial amounts of ETH, thereby increasing the sensitivity of the bacilli to ETH. Overexpression of *ethA* dramatically decreased the MIC of *M. smegmatis* for ETH to a level

**FIG. 4. Locus *Rv3854c* and *Rv3855* of *M. tuberculosis* H37Rv.** A, the *tetR* family members are characterized by a helix-turn-helix motif located in the initial third of the protein. The signature pattern is a conserved domain, which starts four residues before the helix-turn-helix motif and ends six residues after the motif. With the exception of Pro<sup>41</sup>, the *Rv3855* (*ethR*) region from Pro<sup>41</sup> to Val<sup>71</sup>, fits the “Prosite” signature PDOC00830 (*tetR*), strongly suggesting that *Rv3855* (*ethR*) is a transcriptional regulator. B, the *tetR* consensus as determined at the Sanger center is named PF00440. A few members of the family have been chosen, and their PF00440 domain were aligned with *Rv3855* (*ethR*). A more detailed and exhaustive alignment is available from Sanger on the Web. C, *Rv3854c* (*ethA*) belongs to a large and diverse family of monooxygenases. The region homologous to monooxygenases is located in the N-terminal part of the protein.



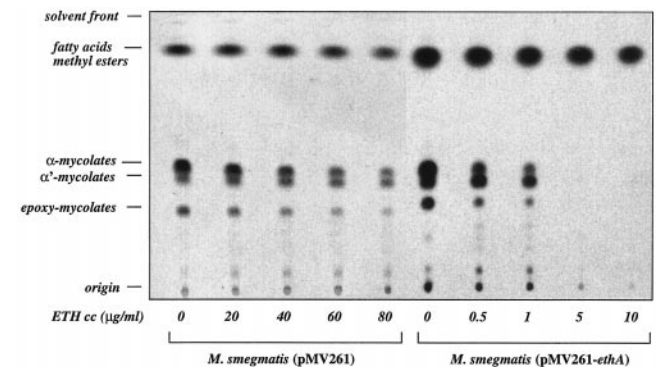
**FIG. 5. Positioning of the transposon insertion in the genome of the clone *M. bovis* BCG NCTC 5692 *ethR*::*hyg*.**



**FIG. 6. The dose-response effects of ETH on FAME and MAME profiles in *M. bovis* BCG NTC 5692 and *M. bovis* BCG NTC 5692 *ethR*::*hyg*.**

comparable to the MIC of *M. tuberculosis* (see Table I). This suggests that in part the innate relative resistance to ETH of *M. smegmatis* is associated with a low production of EthA and thus, indirectly, with EthR. Perhaps this mechanism may also account for the various susceptibility profiles to ETH displayed by other mycobacterial species.

Interestingly, although synthesis of  $\alpha$  and  $\alpha'$  mycolates is insensitive to ETH in *M. smegmatis* overexpressing *ethR*, synthesis of epoxy mycolates remained highly sensitive to the drug in this strain (data not shown). Thus, possible additional targets to InhA exist in relation to ETH and epoxy mycolate synthesis, which has been previously shown to be highly sensitive to ETH (13).



**FIG. 7. The dose-response effects of ETH on FAME and MAME profiles in *M. smegmatis* (pMV261) and *M. smegmatis* (pMV261-*ethA*).**

It is interesting to note that EthA and EthR orthologs are also present in *M. avium* and *M. leprae*. The *EthAR* loci of *M. avium* and *M. tuberculosis* share a very similar architecture. In both cases, the two genes are oriented “head to head” and are separated by a putative 76-bp divergent promoter. In contrast, the two *M. leprae* orthologs are not located in the same locus. The initiation codons of the *M. leprae* *EthA* and *EthR* are found in the genome in positions 86,698 and 1,235,214, respectively. The genome of *M. leprae* seems to be reduced to a minimal pool of genes essential to the survival of this strictly intracellular pathogen. In contrast to many genes of *M. leprae*, *EthA* and *EthR* are apparently not truncated and are highly similar to their orthologs in *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*. Altogether, these observations suggest that these genes have an important role *in vivo*. In addition, the *M. tuberculosis* genome possibly encodes more than 30 monooxygenases, and the relative role of each enzyme in the oxidation of ETH remains to be assessed *in vivo*.

The understanding of the mode of action of ETH is valuable for the design of improved versions of the drug, for the elaboration of potentiating agents, and for the understanding of drug resistance. Finally, an intriguing question, which awaits further experimentation, concerns the possibility of an equivalent mechanism of regulation of *katG* and INH resistance.

*Acknowledgments*—We gratefully acknowledge Françoise Jacob-Dubuisson for critical reading of the manuscript, and W. R. Jacobs (Albert Einstein College of Medicine) and Ken Duncan (Glaxo Wellcome) for the provision/usage of the transposon library.

## REFERENCES

- De Cock, K. M., and Chaisson, R. E. (1999) *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **3**, 457–465
- Liu, J., Barry, C. E. I., and Nikaido, H. (1999) in *Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence* (Ratledge, C., and Dale, J., eds) Blackwell Science Inc, Malden, MA
- Espinal, M. (1999) *WHO/Tuberculosis/260*
- Winder, F. (1982) in *The Biology of the Mycobacteria. Vol. 1, Physiology, Identification and Classification* (Ratledge, C., and Stanford, J., eds) pp. 353–438, Academic Press, London
- Heym, B., Saint-Joanis, B., and Cole, S. T. (1999) *Tubercle Lung Dis.* **79**, 267–271
- Barry, C. E., III, Slayden, R. A., and Mdluli, K. (1998) *Drug Resistance Updates* **1**, 128–134
- Loewen, P. C., Klotz, M. G., and Hassett, D. J. (2000) *ASM News* **66**, 76–82
- Winder, F. G., and Collins, P. B. (1970) *J. Gen. Microbiol.* **63**, 41–48
- Takayama, K., Wang, L., and David, H. L. (1972) *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**, 29–35
- Wang, L., and Takayama, K. (1972) *Antimicrob. Agents Chemother.* **2**, 438–441
- Takayama, K. (1974) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **235**, 426–438
- Winder, F. G., Collins, P. B., and Whelan, D. (1971) *J. Gen. Microbiol.* **66**, 379–380
- Quemard, A., Laneelle, G., and Lacave, C. (1992) *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1316–1321
- Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., Delisle, G., and Jacobs, W. R. (1994) *Science* **263**, 227–230
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., and Cole, S. (1992) *Nature* **358**, 591–593
- Lei, B., Wei, C. J., and Tu, S. C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 2520–2526
- Fattorini, L., Iona, E., Ricci, M. L., Thoresen, O. F., Orru, G., Oggioni, M. R., Tortoli, E., Piersimoni, C., Chiaradonna, P., Tronci, M., Pozzi, G., and Orefici, G. (1999) *Microb. Drug Resist.* **5**, 265–270
- Rist, N. (1960) *Adv. Tuberc. Res.* **10**, 69–126
- Johnsson, K., King, D. S., and Schultz, P. G. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5009–5010
- Ruse, M. J., and Waring, R. H. (1991) *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 233S
- Chieli, E., and Malvaldi, G. (1985) *Biochem. Pharmacol.* **34**, 395–396
- Sauton, M. B. (1912) *C R Acad Sci Paris* **155**, 860–861
- Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T., and Jacobs, W. R., Jr. (1990) *Mol. Microbiol.* **4**, 1911–1919
- Wards, B. J., and Collins, D. M. (1996) *FEMS Microbiol. Lett.* **145**, 101–105
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennet, L. T., Bansal, G. P., Young, J. F., Lee, M. H., Hatfull, G. F., Snapper, S. B., Barletta, R. G., Jacobs, W. R., Jr., and Bloom, B. R. (1991) *Nature* **351**, 456–460
- Jacobs, W. R., Jr., Kalpana, G. V., Cirillo, J. D., Pascopella, L., Snapper, S., Udani, R. A., Jones, W., Barletta, R. G., and Bloom, B. R. (1991) *Methods Enzymol.* **204**, 537–555
- Guyer, M. S. (1978) *J. Mol. Biol.* **126**, 347–365
- Baulard, A., Jourdan, C., Mercenier, A., and Lochet, C. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 4105
- de Lencastre, H., Chak, K. F., and Piggot, P. J. (1983) *J. Gen. Microbiol.* **129**, 3203–3210
- Bardarov, S., Kriakov, J., Carriere, C., Yu, S. W., Vaamonde, C., McAdam, R. A., Bloom, B. R., Hatfull, G. F., and Jacobs, W. R., Jr. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 10961–10966
- Beck, C. F., and Warren, R. A. (1988) *Microbiol. Rev.* **52**, 318–326
- Wilson, M., DeRisi, J., Kristensen, H. H., Imboden, P., Rane, S., Brown, P. O., and Schoolnik, G. K. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 12833–12838
- Shoeb, H. A., Bowman, B. U., Jr., Ottolenghi, A. C., and Merola, A. J. (1985) *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**, 399–403
- Johnson, K., and Schultz, P. G. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 7425–7426
- Rollier, R., and Rollier, M.-T. (1972) *Maroc Med.* **52**, 148–166
- Waters, M. F. R. (1989) in *The Biology of the Mycobacteria. Clinical Aspects of Mycobacterial Disease* (Ratledge, C., Stanford, J., and Grange, J. M., eds) Vol. 3, pp. 405–474, Academic Press, New York
- Ruse, M. J., and Waring, R. H. (1991) *Toxicol. Lett.* **58**, 37–41

## **CHAPITRE 2**

## ***II.1 – EthR, un répresseur de la famille TetR/CamR impliqué dans la résistance à l'éthionamide chez les mycobactéries octamérise de manière coopérative sur son opérateur.***

*Article 2 : EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerises cooperatively on its operator.*

### **Accepté pour publication dans le journal "Molecular Microbiology"**

Jean Engohang-Ndong, David Baillat, Marc Aumercier, Flore Bellefontaine, Gurdyal S. Besra, Camille Loch, and Alain R. Baulard.

L'étude réalisée dans le précédent chapitre nous a permis de proposer l'hypothèse d'une régulation de l'expression de *ethA* par EthR. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de génétique, de biologie moléculaire, de biochimie et de biophysique.

Dans un premier temps, nous avons construit un vecteur contenant le gène rapporteur *lacZ* mis sous la dépendance du promoteur du gène *ethA* ( $P_{ethA}$ ). Sur milieu solide en présence de X-gal, les transformants *M. bovis* BCG 1173P2 présentent une coloration bleue pâle et les transformants *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 arborent une coloration plus franche. Ce résultat indique que les signaux de transcription et de traduction du  $P_{ethA}$  sont effectivement fonctionnels sur plasmide. L'expression en *trans* du gène *ethR* conduit à des clones mycobactériens blancs, montrant que *ethR* régule négativement l'expression du gène *ethA*. La quantification de l'activité  $\beta$ -galactosidase de ces différents clones indique que la répression de *ethA* par EthR est supérieure à 90 %.

Afin de savoir si la répression de *ethA* par EthR se fait de manière directe ou de manière indirecte, nous avons réalisé des expériences de mesure de l'interaction physique entre EthR et la région promotrice du gène *ethA* ( $P_{ethA}$ ). Ces expériences de retard sur gel d'électrophorèse nous ont permis de montrer que la protéine EthR interagit directement et spécifiquement avec  $P_{ethA}$ .

La région intergénique *ethA-R* ne mesure que 75 pb. Il nous a donc paru intéressant de définir dans cette courte région intergénique, le site constituant l'opérateur ainsi que l'organisation des signaux de transcription de *ethA*.

Grâce à des expériences d'empreinte à la DNase I, nous avons défini la zone opératrice de EthR. De façon surprenante, 55 pb sur les 75 pb de la région intergénique sont protégées de la dégradation à la DNase I, suggérant que le répresseur EthR se fixe de manière multimérique sur son opérateur. Cette région de 55 pb démarre 5 nucléotides en amont du premier codon de *ethA* et se termine 16 nucléotides en amont du premier codon de *ethR*.

Après extraction des ARN totaux de *M. bovis* BCG 1173P2, des expériences d'extension d'amorces nous ont permis de déterminer le point de départ de transcription du gène *ethA*. Ainsi, le nucléotide +1 du transcrit se situe 13 nucléotides en amont du premier codon du gène *ethA*. Le point d'initiation de la transcription du gène *ethA* se trouve donc dans la zone couverte par le répresseur, expliquant ainsi la répression par encombrement stérique du promoteur de *ethA* par EthR.

L'analyse en résonance plasmonique de surface d'un fragment d'ADN double brin de 106 pb chevauchant la région intergénique *ethA-R* révèle un rapport stœchiométrique de 8 unités protéiques par molécule d'ADN. Cette expérience a été renouvelée en utilisant la région de 55 pb définie par la technique d'empreinte et a permis de confirmer la fixation octamérique du régulateur sur son opérateur. L'opérateur abrite une séquence répétée directe imparfaite et une séquence inversée répétée également imparfaite. Les mesures de stœchiométrie réalisées sur des fragments d'ADN restreints à ces deux régions suggèrent que la fixation de EthR serait initiée par fixation de deux dimères sur les DRs puis s'étendrait de part et d'autre de ces DRs jusqu'à la formation de l'octamère. L'étude de la cinétique de fixation de EthR sur son opérateur indique un  $K_d$  de 146 nM et un coefficient de Hill (3,46) supérieur à 1, indiquant que la fixation de EthR sur l'ADN se fait de manière coopérative.

EthR est le deuxième cas de fixation coopérative répertorié parmi les répresseurs de la famille TetR/CamR.

Afin d'étudier si EthR est structurée sous forme dimérique ou non en absence de son opérateur, des expériences de double hybride ont été réalisées. Dans ce système, l'interaction de deux protéines aboutit à la complémentation fonctionnelle entre deux domaines de l'adénylate cyclase de *Bordetella pertussis*, conduisant à la synthèse de l'AMPC qui à son tour mène à l'activation des gènes dont la transcription est AMPC-dépendante. Ainsi, *ethR* a été cloné dans les vecteurs pT18 et pT25, générant respectivement les plasmides pT18-*ethR*

---

et pT25-*ethR*. La co-transformation de la souche *E. coli* DHP1 avec les deux constructions conduit à des clones capables de métaboliser du maltose, indiquant qu'en absence de sa cible nucléotidique, EthR conserve au moins une structure homodimérique, classique chez les régulateurs de type TetR/CamR.

Contrairement à la majorité des répresseurs de la famille TetR/CamR dont l'activité de fixation à l'ADN est inhibée par leurs molécules correspondantes (la tétracycline inhibe TetR, les QACs inhibent QacR, ...), EthR ne semble pas être soumis à cette loi puisque le niveau de répression de *ethA* n'est pas modifié en présence d'ETH, quelle que soit la concentration d'ETH. Cette observation peut se justifier par le fait que l'ETH est une drogue synthétique.

*EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerises cooperatively on its operator*

Jean Engohang-Ndong<sup>§</sup>, David Baillat<sup>†</sup>, Marc Aumercier<sup>†</sup>, Flore Bellefontaine<sup>‡</sup>,  
Gurdyal S. Besra<sup>\*</sup>, Camille Locht<sup>§</sup>, and Alain R. Baulard<sup>§#</sup>.

<sup>§</sup>INSERM-U447, and <sup>†</sup>CNRS-UMR8526, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France; <sup>‡</sup>URBM, Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, 61 rue de Bruxelles, B-5000, Namur, Belgium; <sup>\*</sup>School of Biosciences, University of Birmingham, Edgbaston, B15 2TT Birmingham, United Kingdom.

Running title: Regulation of ethionamide resistance in mycobacteria

Keywords: ethionamide; *M. tuberculosis* ; TetR/CamR; repressor; regulation

Abbreviations: c.p.m, counts per min; *Ml*, *Mycobacterium leprae*; RU, resonance units; MDRTB, multidrug resistant tuberculosis; OD, optical density; MIC, minimal inhibitory concentration; EMSA, electrophoretic mobility shift assays; SPR, surface plasmon resonance.

<sup>#</sup>Corresponding author. Telephone: +33 320 87 11 55. E-mail: alain.baulard@pasteur-lille.fr



## Summary

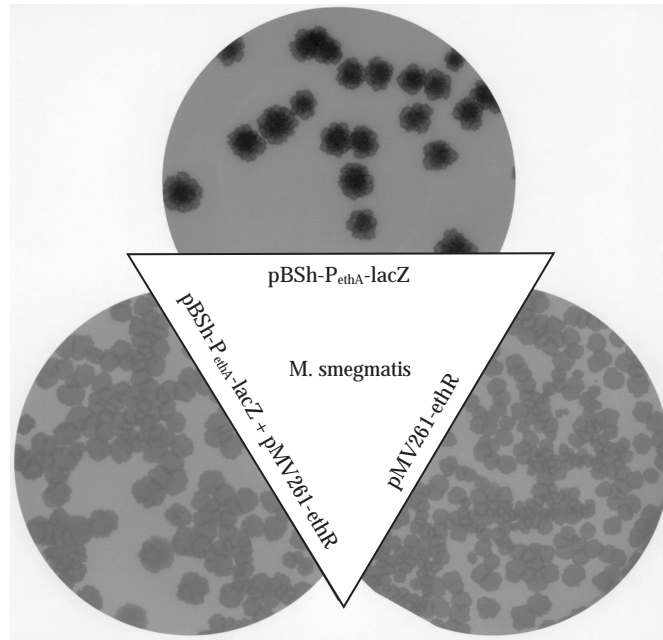
Ethionamide (ETH) is an important second-line antitubercular drug used for the treatment of patients infected with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Although ETH is a structural analogue of isoniazid, only little cross-resistance to these two drugs is observed among clinical isolates. Both isoniazid and ETH are pro-drugs that need to be activated by mycobacterial enzymes to exert their anti-microbial activity. We have recently identified two *M. tuberculosis* genes, Rv3854c (*ethA*) and Rv3855 (*ethR*), involved in resistance to ETH. *ethA* encodes a protein that belongs to the Flavin-containing monooxygenase family catalysing the activation of ETH. We show here that *ethR*, which encodes a repressor belonging to the TetR/CamR family of transcriptional regulators, negatively regulates the expression of *ethA*. By the insertion of the *ethA* promoter region upstream of the *lacZ* reporter gene, overexpression of *ethR in trans* was found to cause a strong inhibition of *ethA* expression, independently of the presence of ETH in the culture media. Electrophoretic mobility shift assays indicated that EthR interacts directly with the *ethA* promoter region. This interaction was confirmed by DNA footprinting analysis, which, in addition, identified the EthR-binding region. Unlike other TetR/CamR members, which typically bind 15-bp operators, EthR recognises an unusually long 55-bp region suggesting multimerization of the repressor on its operator. Identification by primer-extension of the *ethA* transcriptional start site indicated that it is located within the EthR-binding region. Taken together, bacterial two-hybrid experiments and gel filtration assays suggested a dimerisation of EthR in the absence of its operator. In contrast, surface plasmon resonance analyses showed that eight EthR molecules bind cooperatively to the 55-bp operator, which represents a novel repression mechanism for a TetR/CamR member.

## **Introduction**

It is estimated that 7 to 8 million people contract tuberculosis each year. About 50 million people are presently infected with multiple drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB), defined as resistant to both isoniazid (INH) and rifampicin (RIF), the two first-line drugs used to treat tuberculosis (Espinal *et al.*, 2001). These patients are then committed to a regimen of less-active, more expensive and/or more toxic second-line compounds (Mahmoudi and Iseman, 1993). The second-line drug ethionamide (2-ethyl-thioisonicotinamide, ETH, Trescatyl) has been in clinical use for more than 35 years. It is associated with important gastrointestinal disturbances and hepatotoxicity, and thus its prescription is limited mainly for re-treatment of patients relapsing with drug-resistant *M. tuberculosis*, or for the treatment of light skinned lepromatous leprosy patients in replacement of clofazimine (Jenner and Smith, 1987). ETH is a structural analogue of INH, and it has been proposed that both drugs target the same enzyme(s) in the mycobacterial cell (Banerjee *et al.*, 1994; Heym *et al.*, 1994). In addition, both drugs are pro-drugs that have to be converted to active compounds by specific mycobacterial enzymes (Baulard *et al.*, 2000; DeBarber *et al.*, 2000; Vannelli *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 1992). However, one of the most striking differences between the two drugs is their respective minimal inhibitory concentration (MIC). To ensure ETH concentrations in body fluids in excess of the *in vitro* MIC (2.5 µg/ml) (Rist *et al.*, 1958), it is recommended to use a daily dosage of 10 mg/kg (Johnston *et al.*, 1967), 5 times more than the recommended dosage for INH.

As the majority of anti-tuberculosis drugs, ETH is a narrow-spectrum molecule, whose activity is primarily restricted to mycobacteria, presumably because it interacts with targets that are only found in mycobacteria. Alternatively, the specificity may result from the accumulation or activation of the drug by uptake systems or converting enzymes unique to mycobacteria. Recently, we and others have independently identified two genes, *ethA* and *ethR* involved in the activation of the pro-drug ETH (Baulard *et al.*, 2000; DeBarber *et al.*, 2000). EthA is a FAD-containing enzyme that catalyses two steps in the activation of ETH (Vannelli *et al.*, 2002). The expression of *ethA* is under the control of the neighbouring gene *ethR*, as over-expression of *ethR* leads to ETH resistance, and chromosomal inactivation of *ethR* is associated with ETH hypersensitivity, indicating that not all the ETH molecules are activated in wild type mycobacteria. Based on sequence similarities, EthR is a member of the TetR/CamR protein family (Aramaki *et al.*, 1995b), suggesting that EthR represses *ethA*

A



B

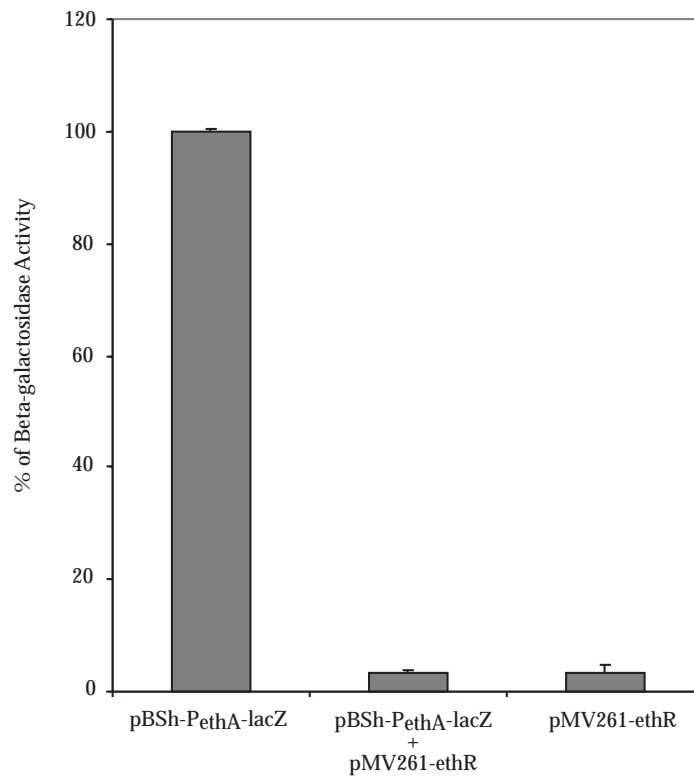


Figure 1.  $\beta$ -galactosidase activity in transformed mycobacteria. A. Detection of  $\beta$ -galactosidase activity of *M. smegmatis* transformed with a) pBSh-PethA-lacZ ; b) pBSh-PethA-lacZ + pMV261-ethR ; c) pMV261-ethR and plated onto LB plates supplemented with X-gal. B. Quantification of  $\beta$ -galactosidase activity of *M. bovis* BCG transformed with a) pBSh-PethA-lacZ ; b) pBSh-PethA-lacZ + pMV261-ethR ; c) pMV261-ethR. Each value is the average of three culture replicates.

expression in *M. tuberculosis*. A detailed understanding of the regulatory mechanisms of *ethA* by EthR may therefore help to develop strategies for a more efficient activation of ETH by the mycobacteria. Such strategies, if applicable *in vivo*, could then allow one to optimise the therapeutic window by reducing the dosages of ETH, thereby decreasing the side effects of the drug.

In this work, we examined the molecular details of the regulatory effect of EthR on *ethA* expression. We established that EthR acts as a repressor of *ethA* expression through direct binding to the *ethA* upstream region, and that ETH does not interfere with the repressor activity of EthR. In comparison to other TetR/CamR family repressors, EthR and its operator harbour original features. The *ethA* operator is remarkably large, comprising 55 bp, which is nearly four times as long as the operators of most of the other TetR/CamR family members (Godsey *et al.*, 2002). Whereas EthR is probably a dimer in the absence of the operator, binding occurs in a cooperative fashion involving 8 EthR molecules per operator, as evidenced by surface plasmon resonance.

## **Results**

### ***Repression of ethA by EthR***

Previously, we have shown that overexpression of *ethR* results in increased ETH resistance in mycobacteria, whereas mutational inactivation of *ethR* results in increased ETH sensitivity (Baulard *et al.*, 2000), suggesting that EthR negatively regulates the production of EthA, the putative monooxygenase required for ETH activation. To confirm this hypothesis, the promoter region of *ethA* was inserted upstream of the reporter gene *lacZ* in pBSh-D, an *E. coli*-mycobacteria shuttle vector that replicates as a single copy in mycobacteria (Picardeau *et al.*, 2000). The resulting vector, named pBSh-P<sub>*ethA*</sub>-*lacZ* was electro-transformed into *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 and *M. Bovis* BCG 1173P2. The recombinant *M. smegmatis* colonies exhibited a strong blue colour on M7H11 plates supplemented with X-gal (Fig. 1A), indicating expression of *ethA* under these conditions. A pale blue colour was observed for the *M. bovis* BCG (pBSh-P<sub>*ethA*</sub>-*lacZ*) colonies (data not shown). The two recombinant strains were then co-transformed with pMV261-*ethR*, a compatible multicopy vector containing *ethR* (Baulard *et al.*, 2000). The resulting *M. smegmatis* and *M. bovis* BCG colonies were white on X-gal supplemented plates, indicating that the presence of *ethR* represses the expression of *ethA*. In order to confirm the phenotype in *M. bovis* BCG, we quantified the  $\beta$ -galactosidase activity of the recombinant strains. *M. bovis* BCG (pBSh-

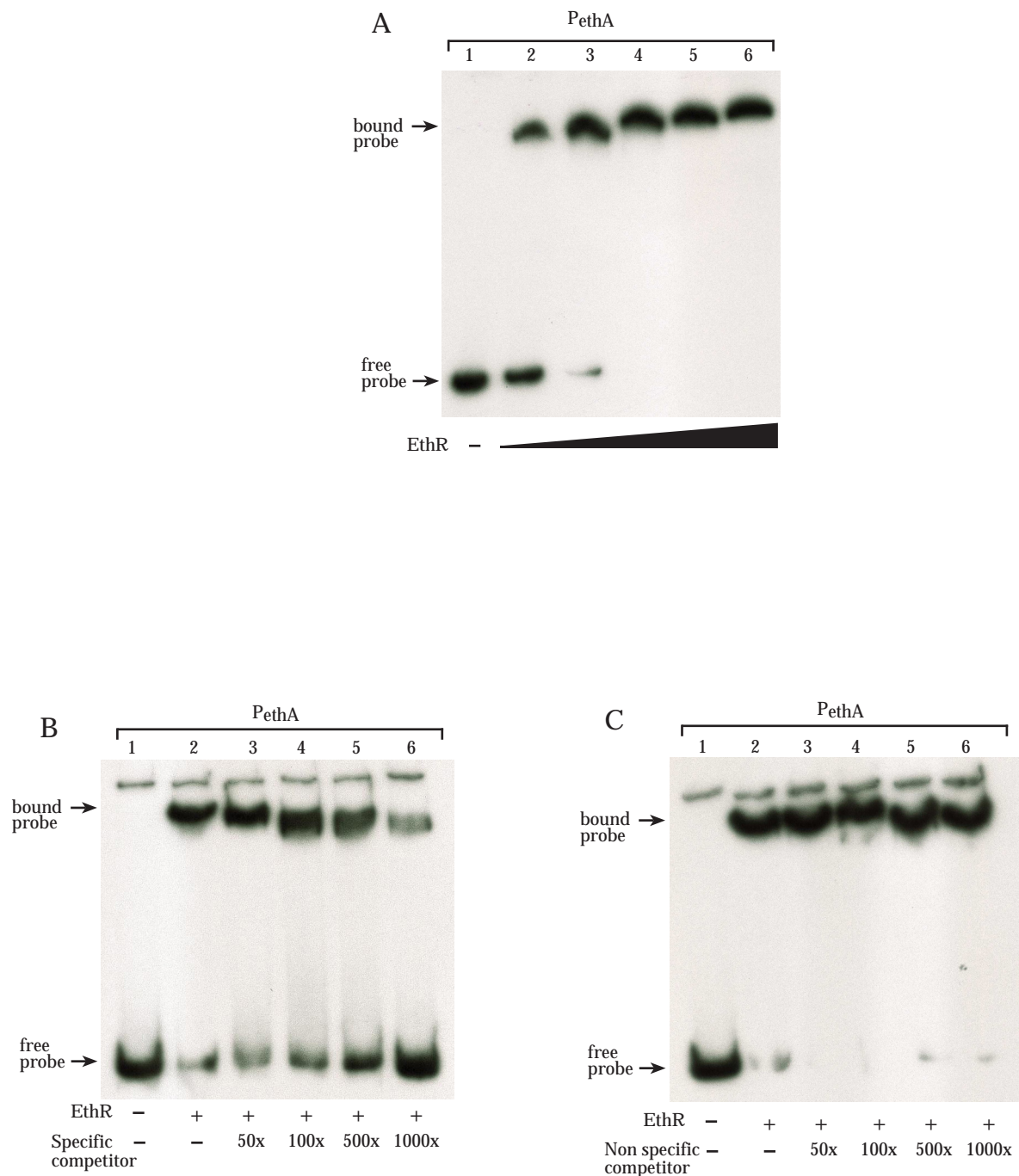


Figure 2. EMSA of His<sub>6</sub>-EthR-binding to the ethA-R intergenic region. The 191-bp labelled probe (100,000 c.p.m) was mixed with 0 µg (lanes 1), 0.45 µg (lanes 2), 0.90 µg (lanes 3), 1.35 µg (lanes 4), 1.8 µg (lanes 5) or 3.6 µg (lanes 6) His<sub>6</sub>-EthR in the absence (A) or presence of the indicated excess of the unlabelled ethA-R intergenic region used as specific competitor (B) or of non-specific competitor DNA (C). EMSAs in panels B and C were performed without (lane 1) or with 0.9 µg (other lanes) of purified His<sub>6</sub>-EthR.

$P_{ethA-lacZ}$ ) exhibited a significantly higher  $\beta$ -galactosidase activity (15.7 U) than BCG co-transformed with pBSh- $P_{ethA-lacZ}$  and pMV261-*ethR* (0.51 U) (Fig.1B.). Thus, the overexpression of *ethR* in *M. smegmatis* and in BCG led to a strong inhibition of the *ethA* expression. These results confirm the hypothesis that EthR negatively regulates the expression of *ethA*. By analogy to the capacity of tetracycline to inhibit TetR binding on its operator, the influence of ETH on the repressor activity of EthR was evaluated. *M. smegmatis* co-transformed with pBSh- $P_{ethA-lacZ}$  and pMV261-*ethR* was grown in various concentrations of ETH, and the  $\beta$ -galactosidase activities were measured. The  $\beta$ -galactosidase activities did not appear to be influenced by ETH treatment (data not shown), indicating that ETH does not impair the capacity of EthR to repress *ethA*, even at high concentrations.

### ***Binding of EthR to $P_{ethA}$ demonstrated by Electrophoretic Mobility Shift Assays***

To investigate whether the repression of *ethA* by EthR occurs via direct physical interaction between the *ethA* promoter region ( $P_{ethA}$ ) and EthR, electrophoretic mobility shift assays (EMSA) were performed on a 191-bp [ $^{32}$ P]-end-labelled DNA fragment containing the intergenic *ethA-R* region PCR-amplified from *M. tuberculosis* H37Rv chromosomal DNA. Recombinant full-length EthR was histidine-tagged (His<sub>6</sub>-EthR) at its N terminus to facilitate the purification of the enzyme using Ni<sup>2+</sup>-chelate affinity chromatography. As shown in Fig. 2A, the addition of increasing amounts of purified His<sub>6</sub>-EthR to the [ $^{32}$ P]-end-labelled DNA fragment resulted in the retardation of fragment migration in native polyacrylamide gels, indicating that EthR is able to bind to the intergenic *ethA-R* region. Specific and non-specific DNA competitors were used to evaluate the binding specificity of His<sub>6</sub>-EthR to the promoter region of *ethA* (Fig. 2B and 2C). The reappearance of free probe was observed when 500- and 1000-fold excess of specific competitor (unlabelled probe) was added to the mixture containing the labelled probe and His<sub>6</sub>-EthR, whereas the same amount of non-specific competitor (see experimental procedure) did not modify the interaction between His<sub>6</sub>-EthR and the labelled probe.

### ***Determination of EthR binding sites***

To precisely localise the *ethA* operator, DNase I footprinting assays were performed on both strands of the DNA. Two fragments (a 323-bp *Hind*III-*Sph*I fragment and a *Xho*I-

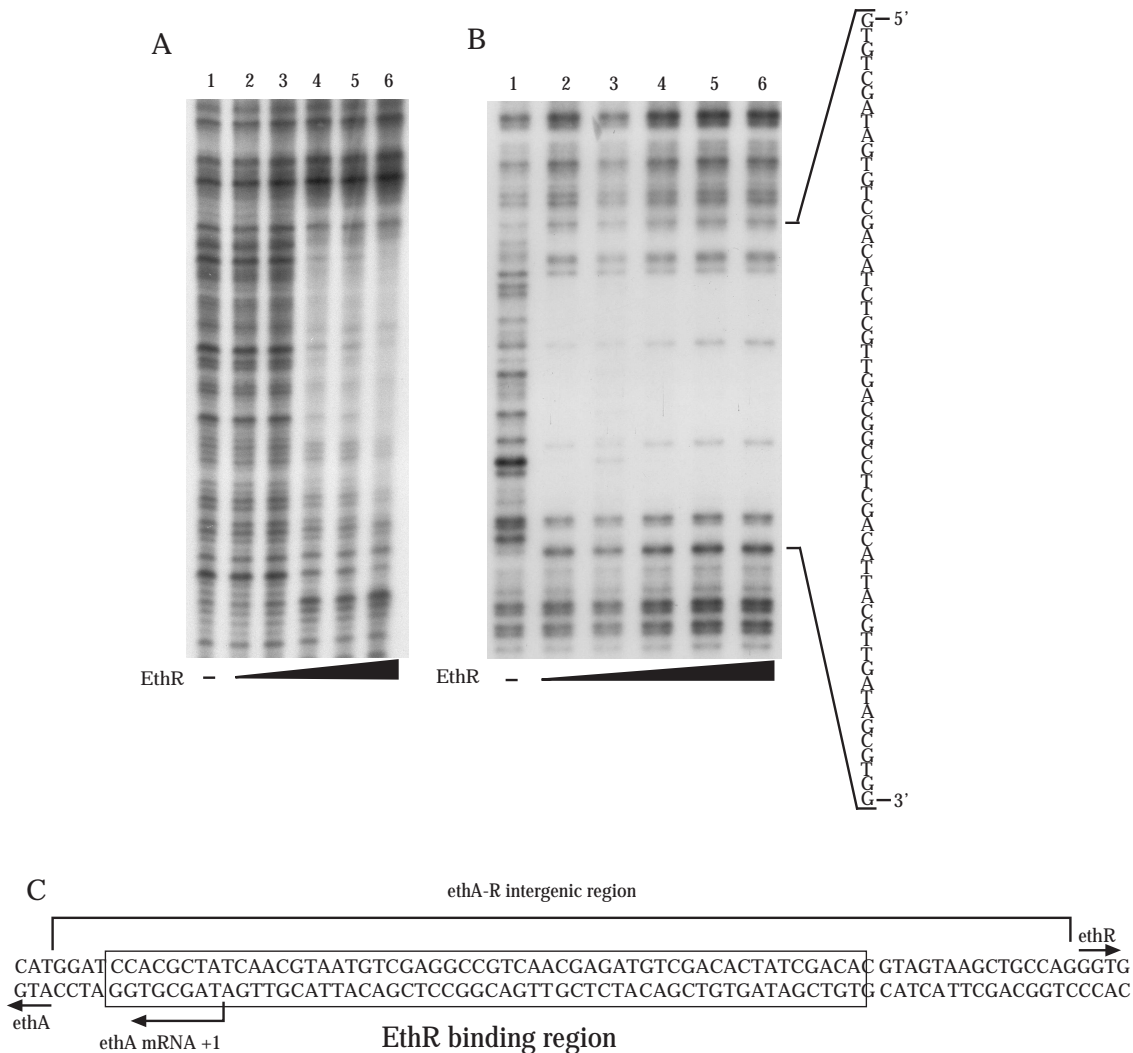


Figure 3. A & B: DNase I protection of the ethA-R intergenic region by His6-EthR. The protected region was identified using a sequencing ladder generated with universal primer and M13mp18 (not shown). The 2 probes (Panel A: 323-bp HindIII-SphI fragment; Panel B: 312-bp XhoI-HindIII fragment) were incubated without (lanes 1) or with various amounts of His6-EthR (on panel A: lane 2, 0.0625  $\mu$ g; lane 3, 0.125  $\mu$ g; lane 4, 0.25  $\mu$ g; lane 5, 0.5  $\mu$ g; lane 6, 1 mg; on panel B: lane 2, 1  $\mu$ g; lane 3, 2.5  $\mu$ g; lane 4, 5  $\mu$ g; lane 5, 7.5  $\mu$ g and lane 6, 10  $\mu$ g) prior to DNase treatment. (C), Location of the region protected by His6-EthR against DNase I digestion. (D), Primer extension analysis. The radiolabelled oligonucleotide O-273 was hybridised to total RNA extracted from *M. bovis* BCG 1173P2, and primer extension was performed as described in “experimental procedures”. The same oligonucleotide was used as a primer for DNA sequencing. The sequence of the coding strand is shown and the transcriptional start site is underlined. The architecture of the ethA-R intergenic region showing an overlap of the transcriptional start site of ethA and the ethA operator is proposed in panel C.

*Hind*III fragment) containing the intergenic *ethA-R* region were end-labelled on opposite strands. For both fragments, purified His<sub>6</sub>-EthR was able to protect the same 55-bp region from moderate DNase I digestion (Fig. 3 A & B). This region is located from 5 nucleotides upstream from the *ethA* start codon to 16 nucleotides upstream from the *ethR* start codon, thus covering 55 bp out of the 75-bp intergenic region (Fig. 3C). Thus, EthR binds an unusually long region of DNA, suggesting that it interacts as a functional multimer with its operator. Interestingly, DNase I protection assays performed with either low (Fig. 3A) or high (Fig. 3B) His<sub>6</sub>-EthR concentrations resulted in equivalent footprints, suggesting cooperative association of the protein to the operator.

#### *Identification of the transcriptional start point of the ethA gene*

To understand the mechanism of *ethA* repression by EthR, the transcriptional start point of *ethA* was identified using primer extension analysis. When total RNA prepared from *M. bovis* BCG 1173P2 was subjected to primer extension analysis, a unique product was identified, starting with nucleotide A located 13 bp upstream of the *ethA* translational initiation codon (Fig. 3D). This result indicates that the transcriptional start site of *ethA* and the RNA polymerase recognition sites overlap the *ethA* operator (Fig.3C).

When the sequence upstream of the *ethA* transcriptional start site was compared with sequences of other mycobacterial promoter structures, no obvious conserved putative -10 or -35 box could be identified (Fig. 3C). The *ethA* promoter does not resemble the *E. coli*  $\sigma^{70}$  consensus and thus should be classified in Group C of regulated promoters proposed by Gomez (Gomez and Smith, 2000).

#### ***Stoichiometry of the interaction between His<sub>6</sub>-EthR and the intergenic ethA-R region.***

A biotinylated double stranded 106-bp long DNA fragment (Fig. 4A; IG-106) overlapping the intergenic *ethA-R* region was used as the ligand to measure the stoichiometry of His<sub>6</sub>-EthR binding by surface plasmon resonance (SPR). Increasing concentrations of His<sub>6</sub>-EthR were injected over the Sensor Chip functionalised with 205 RU of the biotinylated DNA fragment until saturation of the ligand was reached at the equilibrium phase (Fig. 4B). Given that His<sub>6</sub>-EthR has a calculated Mr of 25,920 and 205 RU of the DNA fragment (69 kDa) were fixed to the surface of the Sensor Chip, the His<sub>6</sub>-EthR:DNA ratio was estimated from **Eq. 1** for each His<sub>6</sub>-EthR concentration. A



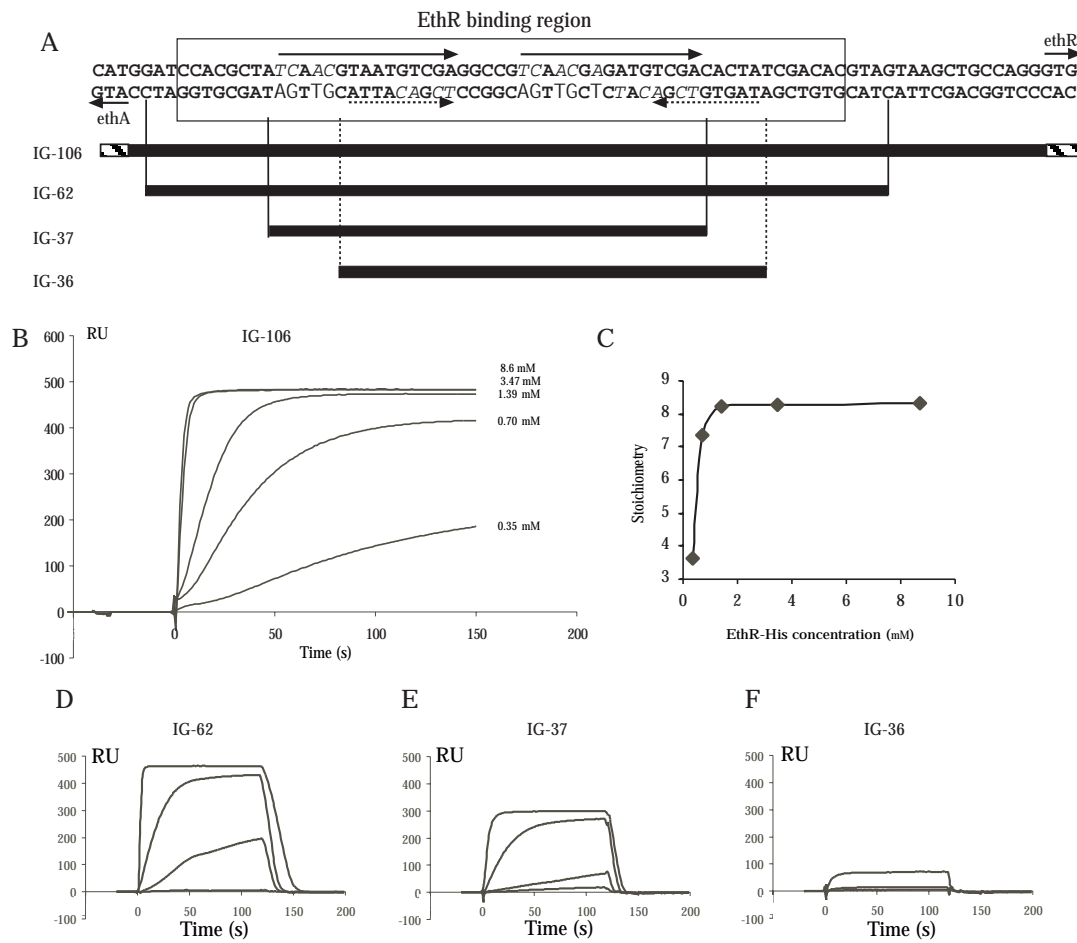


Figure 4. Global affinity and stoichiometry of the interaction between His<sub>6</sub>-EthR and P<sub>ethA</sub> measured by SPR. A) Structure of the EthA-R intergenic region. Four sub-regions (IG-106, -62, -37, -36) were tested by SPR for their capacity to bind His<sub>6</sub>-EthR. IG-106 extends over the entire intergenic region. IG-62 overlaps the protected 55-bp region. IG-37 overlaps two imperfect DR (full arrows) which include imperfect IR (italicised bases). IG-36 overlaps two imperfect IR (dotted arrows) ; B) Sensorgrams of 0.35, 0.70, 1.39, 3.47 and 8.6 μM His<sub>6</sub>-EthR injections over a Sensor Chip functionalised with 205 RU of the biotinylated intergenic ethA-R region IG-106. A flow cell functionalised with 205 RU of the double stranded -276 to -176 fragment of the human stromelysin-1 promoter was used as a reference for non-specific binding ; C) Binding stoichiometry as a function of His<sub>6</sub>-EthR concentration. Stoichiometries were estimated using Eq. 1 given in “experimental procedures” ; D) Sensorgrams of 0.612, 1.25, 2.50 and 5 μM His<sub>6</sub>-EthR injections over a Sensor Chip functionalised with 205 RU of the IG-62 biotinylated fragment ; E) IG-37 biotinylated fragment ; and F) IG-36 biotinylated fragment.

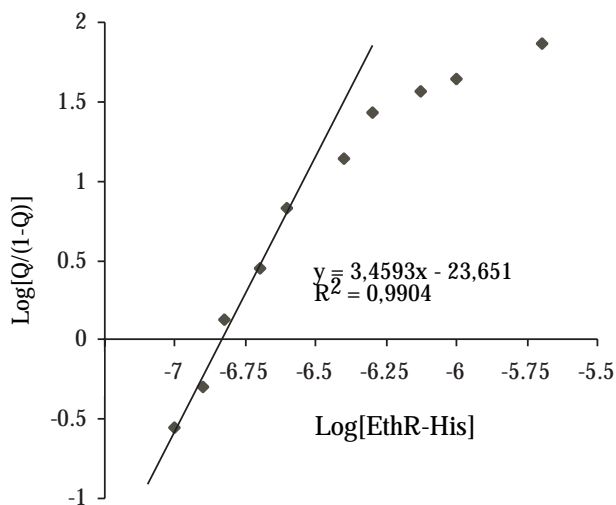


Figure 5. Hill plot for the His<sub>6</sub>-EthR binding to the intergenic ethA-R region. His<sub>6</sub>-EthR was injected at concentrations ranging from 0.1 to 2 M over a Sensor Chip functionalised with 100 RU of the DNA until equilibrium was reached. At equilibrium, the binding signals were measured, and the Hill function was plotted as a function of log[His<sub>6</sub>-EthR]. The linear portion of the Hill function (from = 0.2 to 0.8) is approximated as described in “experimental procedure”. The equation and the determination coefficient of the linear regression ( $R^2$ ) are indicated. The slope  $n_H=3.46$  corresponds to the Hill coefficient and the global dissociation constant ( $K_D$ ) is 146 nM (= 0.5).

stoichiometry of 8 molecules of His<sub>6</sub>-EthR per DNA molecule was deduced. Interestingly, this stoichiometry was very rapidly reached at a concentration threshold of His<sub>6</sub>-EthR (Fig. 4C). This experiment was repeated using a 62-bp biotinylated double stranded DNA fragment (Fig. 4A; IG-62) overlapping the 55-bp region identified by the DNase I footprinting assays. An identical stoichiometry of 8 molecules of His<sub>6</sub>-EthR per DNA molecule was measured (Fig. 4D), confirming that all the repressor molecules bind within the DNase I protected region. If we assume that a homo-octamer is likely to display some symmetry in binding, the centre of the DNase I-protected region (the G at base 32 of the *ethA-R* intergenic region) nearly divides two copies of a long direct repeat (*T-C-A-A-C-G-t/a-a/g-A-T-G-T-C-G-A*) which itself includes imperfect inverted repeats (italicised bases, Fig. 4A). When a 37-bp fragment (Fig. 4A; IG-37) overlapping these two direct repeats was fixed to the surface of the Sensor Chip, a cooperative binding of an average of 4.5 molecules of His<sub>6</sub>-EthR per DNA molecule was observed (Fig. 4E). When a 36-bp long PCR fragment (Fig. 4A; IG-36) overlapping two nearly perfect inverted repeats (*T-A-a/g-T-G-T-C-G-A*) centred at base 34 was used, His<sub>6</sub>-EthR binding was strongly decreased (Fig. 4F).

***Determination of the Hill coefficient ( $n_H$ ) and the  $K_D$  of the interaction between His<sub>6</sub>-EthR and the intergenic *ethA-R* region.***

In order to estimate the affinity of His<sub>6</sub>-EthR for the *ethA-R* intergenic region, equilibrium analyses of the interaction were performed. One hundred RU of the above 106-bp biotinylated DNA fragment (IG-106) were immobilised on a Sensor Chip. This low amount of immobilised DNA allowed the protein to reach binding equilibrium for a wider range of protein concentrations (from 0.1 to 2  $\mu$ M) in the maximum injection volume possible for the BIAcore2000<sup>®</sup> apparatus. Under these conditions, the capacity of the Sensor Chip was estimated to be  $R_{max}=225$  RU, corresponding to the same stoichiometry of 8 His<sub>6</sub>-EthR molecules as deduced in the former SPR experiments. The fractional saturation of the DNA at equilibrium,  $\Theta=R_{eq}/R_{max}$  (where  $R_{eq}$  is the RU value measured at equilibrium) was determined for each protein concentration. The Hill function (Fersht, 1985),  $\log\left[\frac{\Theta}{1-\Theta}\right]$ , was plotted as a function of the  $\log[\text{His}_6\text{-EthR}]$  (Fig. 5). The analysis of the linear part of the Hill function (from  $\Theta=0.2$  to  $\Theta=0.8$ ) by linear regression ( $R^2=0.9904$ ) provided a global equilibrium binding constant ( $K_D$ ) of 146 nM and a Hill coefficient ( $n_H$ ) of 3.46. The  $K_D$  value represents an average value for the eight binding sites. The maximum theoretical value

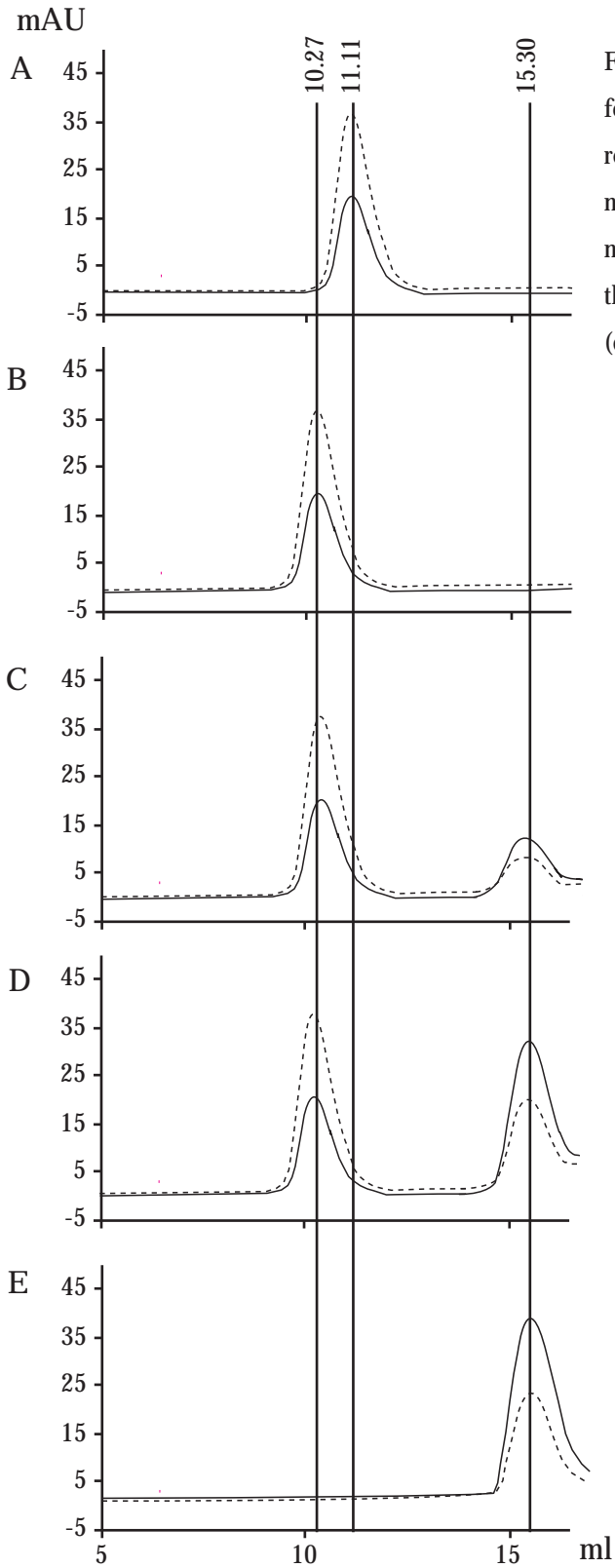


Figure 6. Gel filtration chromatography. Superdex 200 elution profiles for 0.108 nmole of a PCR fragment overlapping the ethA-R intergenic region in the absence (A) or presence of (B) 0.385 nmole, (C) 1.920 nmole, (D) 3.850 nmole of purified His<sub>6</sub>-EthR. (E) contains 3.850 nmole of purified His<sub>6</sub>-EthR in the absence of DNA. Y axis indicates the relative absorbencies (mAU, milliAbsorbance Unit) at 260 nm (dotted line) and at 280 nm (full line).

of the Hill coefficient is 8 and corresponds to the number of binding sites for His<sub>6</sub>-EthR. The 3.46 value of the Hill coefficient higher than 1 indicates a cooperative binding of His<sub>6</sub>-EthR onto the DNA probe (Fersht, 1985).

### ***Requirement of the presence of the operator for His<sub>6</sub>-EthR octamerisation***

The SPR experiments indicated that EthR binds cooperatively as a homo-octamer to the *ethA* operator. To determine whether the multimerization of EthR requires the presence of its cognate DNA target, His<sub>6</sub>-EthR was subjected to analytical size exclusion chromatography on a Superdex 200 HR 10/30 column in the presence of a 94-bp PCR fragment containing the *ethA-R* intergenic region (see “Experimental procedures”). The 94-bp DNA fragment was found to elute as a single peak with a maximal absorbency at 260 nm at a  $V_e$  (elution volume) of 11.11 ml (Fig. 6A). The addition of low amounts of purified His<sub>6</sub>-EthR to the 94-bp DNA fragment resulted in the elution of a single peak with a maximum absorbency at 260 nm at  $V_e = 10.27$  ml (Fig. 6B). As these results were obtained in the same salt conditions as those used for the SPR analyses, the decreased elution volume of the DNA in the presence of His<sub>6</sub>-EthR most likely corresponds to an increase in the molecular mass of the 94-bp DNA complex due to the binding of the protein octamer to the operator site. The addition of increasing amounts of His<sub>6</sub>-EthR to the DNA fragment led to the progressive appearance of an additional peak eluting 15.30 ml after loading, with a maximum absorbency at 280 nm (Fig. 6C & D). This peak corresponds to a molecule with a stokes radius roughly equivalent to that of the molecular mass standard Chymotrypsinogen A (25,000-Da) (Amersham Biosciences). These data were confirmed by the determination of the elution volume of His<sub>6</sub>-EthR in the absence of DNA fragment (Fig. 6E) and strongly suggest that under the *in vitro* conditions which allow His<sub>6</sub>-EthR to bind to its operator, unbound repressor does not adopt a large multimeric form, but rather a monomeric form instead. However, since size exclusion chromatography is based on the stokes radius rather than on the molecular mass *per se*, we can not exclude that His<sub>6</sub>-EthR dimerises in solution in the absence of its cognate operator site.

### ***Oligomerisation of EthR in vivo***

To investigate whether EthR may dimerise in the absence of its cognate DNA, we used the bacterial two-hybrid system (BACTH) (Karimova *et al.*, 1998). In this system, the

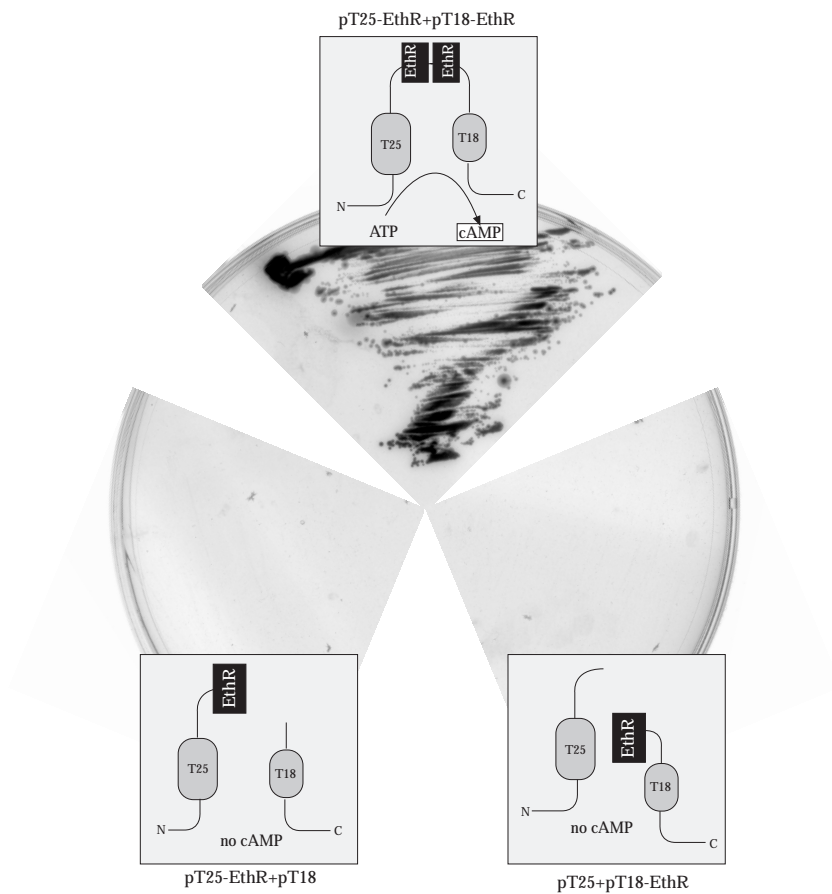


Figure 7. In vivo interaction between EthR molecules. pT18-EthR carries a fusion between ethR and a fragment corresponding to the T18 fragment of *B. pertussis* CyaA. pT25-EthR carries a fusion between ethR and a fragment corresponding to the T25 fragment of CyaA. No growth or blue colour on minimal media/maltose/X-gal agar plates was detected when pT18-EthR + pT25 or pT25-EthR + pT18 were introduced into *E. coli* DHP1. When co-introduced into *E. coli* DHP1, pT25-EthR and pT18-EthR yielded blue transformants on minimal media/maltose/X-gal agar plates.

interaction of two proteins results in functional complementation between two domains of the adenylate cyclase (CyaA) from *Bordetella pertussis*, leading to cAMP synthesis. As a soluble regulatory molecule, cAMP is then able to activate cAMP-dependent transcription. *ethR* was thus cloned in frame with the region coding for the 25-kDa domain of CyaA, giving rise to pT25-EthR. *ethR* was then fused with the region coding for the 18-kDa domain of CyaA to produce pT18-EthR. A cyclase-deficient *E. coli* strain (DHP1) (Karimova *et al.*, 1998) was transformed with various combinations of plasmids (Fig. 7). When co-transformed with pT25-EthR and pT18-EthR, the colonies recovered their capacity to metabolise maltose on minimal medium agar plates supplemented with maltose. None of the clones obtained by the co-transformation of various control plasmids were able to grow, demonstrating that the functional complementation of T25-EthR and T18-EthR was specifically mediated by the interaction of two EthR molecules (Fig. 7). Since no DNA homologous to the EthR operator has been detected in the genome of *E. coli*, this result suggests that EthR is a dimer when not bound to its operator.

### **Discussion**

The anti-tuberculosis drug ETH is a structural analog of INH. We and others have recently demonstrated that, similarly to INH, ETH is a pro-drug and therefore must undergo metabolic activation within the mycobacteria to exert its toxicity (Baulard *et al.*, 2000; DeBarber *et al.*, 2000; Vannelli *et al.*, 2002). Despite the structural similarity between these two compounds, they are not activated by the same enzymes. The catalase KatG is responsible for the activation of INH but has no effect on the activation of ETH (Zhang *et al.*, 1992). In contrast, ETH is activated by the monooxygenase EthA (Rv3854), which has no apparent effect on the activation of INH (Baulard *et al.*, 2000; DeBarber *et al.*, 2000). ETH can also be activated by liver monooxygenases, giving rise to high hepatotoxicity in humans (Ruse and Waring, 1991b). Therefore, the use of ETH as an anti-mycobacterial drug is problematic (Ruse and Waring, 1991a; Waters, 1989).

As a FAD-containing monooxygenase, EthA oxidises ETH to the corresponding S-oxide, which through further oxidation leads to what is believed to be the actual cytotoxic compound (DeBarber *et al.*, 2000; Vannelli *et al.*, 2002). Previous genetic studies have suggested that the production of EthA is regulated by the product of the neighbouring gene *ethR* (Baulard *et al.*, 2000; DeBarber *et al.*, 2000). EthR is a member of the TetR/CamR family of transcriptional regulators, which share highly homologous N-terminal DNA-

binding domains connected to seemingly non-homologous ligand-binding domains (Aramaki *et al.*, 1995b).

Overproduction of EthR in *M. smegmatis* or in *M. bovis* BCG resulted in decreased expression of *ethA*, as evidenced by translational fusion of *ethA* to the *lacZ* reporter gene, confirming *ethA* repression by EthR. The presence of ETH did not interfere with the repressor activity of EthR, in contrast to the interference of the TetR repressor activity by the presence of tetracycline (Orth *et al.*, 2000). Electrophoretic mobility shift assays indicated a direct and specific physical interaction between recombinant EthR and the *ethA-R* intergenic region. Surprisingly, DNase I footprinting analyses revealed that, unlike most other TetR members, which classically bind 15-bp operators, 55 nucleotides out of the 75-bp long *ethA-R* intergenic region were protected by EthR. Another exception is the 28-bp operator of the *Staphylococcus aureus* QacR protein that represses the *qacA* multidrug transporter gene. This length, which is nearly twice that of other characterised operators of TetR/CamR family members, is due to the cooperative binding of QacR tetramers on the operator (Grkovic *et al.*, 1998; Schumacher *et al.*, 2001). As the molecular weights of EthR and QacR are in the same range, the 55-bp long *ethA* operator is compatible with the binding of an octameric EthR complex.

Primer extension analysis unveiled a unique *ethA* transcriptional start site located within the EthR-protected region. A striking feature of the *ethA-R* intergenic region is its small size, implying an overlap between the *ethA* and *ethR* promoters, and between the operator and the promoters. This structure is reminiscent of the topology of the 81-bp long *tetA-R* intergenic region (Hillen and Berens, 1994). The physical overlap between the *ethA* promoter and the operator sites suggests that the interaction of the RNA polymerase with the promoter is sterically hindered by the binding of EthR to the intergenic region. Moreover, the unusually long 55-bp operator suggests that the binding of EthR prevents the RNA polymerase from interacting with both the *ethA* and *ethR* promoters. This would then result in the repression of both *ethA* and *ethR* by EthR. Thus, similar to other TetR family members (Hillen and Berens, 1994), EthR probably regulates its own expression. However, due to the very low expression levels of *ethR* (data not shown), we have not been able to address this directly for EthR.

The ability of EthR to protect a 55-bp region strongly suggests binding of the repressor in a multimeric form. This hypothesis was confirmed by the use of SPR to measure the apparent stoichiometry of EthR binding to the operator. This analysis revealed that 8 molecules of EthR bind to the operator, and that this stoichiometry is very rapidly reached at

a concentration threshold of protein. Gel filtration experiments confirmed that a high molar excess of EthR over the operator site is needed before free repressor molecules can be detected, indicating that the operator requires a high repressor to operator ratio to be saturated. This observation suggests a positive cooperative binding mechanism for EthR. Strong cooperativity was confirmed by equilibrium analysis of the interaction by the use of SPR, as revealed by a Hill coefficient of 3.46. This cooperative binding mechanism is in agreement with DNaseI footprinting experiments showing that above a certain threshold level, the repressor protects the same 55-bp *ethA-R* intergenic region independently of the EthR concentration.

SPR experiments confirmed that the region identified by the DNaseI footprinting assay corresponds to the binding-zone of an octamer of EthR. This 55-bp region contains two DR potentially implicated in the binding of the repressor. This hypothesis was confirmed by the fact that a DNA fragment limited to the region overlapping the DR still showed a highly specific cooperative binding of EthR, but with a reduce stoichiometry of proteins per DNA (average: 4.5). In contrast, a fragment switched 7 bp to the right (bordered by two 9-bp IR) had a highly reduced capacity to bind EthR. These observations suggest that the two long DR are required for the binding of two dimers of EthR, which then may initiate the cooperative binding of other EthR molecules on secondary sites in the 55-bp region.

Based on the presence of a typical helix-turn-helix DNA-binding motif in its amino terminal portion, EthR can be classified as a member of the TetR family of regulators. A large majority of prokaryotic proteins that use a HTH motif to bind their operator function as a homodimer, with each motif binding one half-site of symmetrical DNA patterns (Huffman and Brennan, 2002). TetR and CamR for which the DNA-binding stoichiometry is known, bind as one dimer per operator (Aramaki *et al.*, 1995a; Hillen and Berens, 1994). In contrast, two separate QacR dimers have been shown to bind to two operator half sites (Grkovic *et al.*, 2001). In each case, dimerisation of the repressor occurs before its binding to the operator. However, some exceptions, such as members of the AraC family, bind their operator as monomers (Gallegos *et al.*, 1997), and others, such as BirA, dimerise only in the presence of their co-repressor (Weaver *et al.*, 2001). Our analytical size exclusion chromatography results suggest that unbound EthR elutes from the column with an elution volume compatible with a monomeric form of the repressor. However, the stokes radiant of EthR dimers may be indistinguishable from that of monomers, as it may be the case for QacR, whose gyration radius deduced from the crystal structure is 18.3 Å for the monomer and 21.7 Å for the dimer. This leaves us with the possibility that EthR may be a dimer in the absence



of its cognate operator site. Alternatively, Superdex column have been previously described to induce artefacts, producing monomers of known dimeric regulators (Grkovic *et al.*, 2001). Therefore, the BACTH system has been used to distinguish between the two possibilities suggested by the size exclusion chromatography. The BACTH experiments revealed indeed an interaction between two EthR molecules in *E. coli* in the absence of cognate DNA.

Overexpression of *ethA* in mycobacteria has been shown to increase ETH sensitivity (Baulard *et al.*, 2000; DeBarber *et al.*, 2000). In addition, an *ethR* null mutation in BCG also resulted in increased ETH sensitivity compared to the parent strain in standard laboratory conditions (Baulard *et al.*, 2000). These observations suggest that naturally *ethA* is partially repressed in mycobacteria, and that therefore the sensitivity of mycobacteria to ETH may perhaps be increased by interfering with EthR function or the expression of its gene. The identification of factors that may down-regulate EthR production, and consequently diminish repression of *ethA*, should thus lead to optimised treatments using lower concentration of ETH, thereby reducing its hepatotoxicity in the host. In a recent study, *ethA* transcription in *M. tuberculosis* has been shown to be repressed by iron in an IdeR-independent manner (Rodriguez *et al.*, 2002). However, in our hands, neither BCG nor *M. smegmatis* showed variations of ETH resistance when grown at various iron concentrations, suggesting that the observed *ethA* regulation is perhaps not sufficient to modify ETH sensitivity.

The leprosy bacillus is also known to be sensitive to ETH derivatives such as prothionamide (Waters, 1989). Both the monooxygenase EthA and the regulator EthR are conserved in *Mycobacterium leprae*. Astonishingly, *MI*EthA is the only member of the *M. tuberculosis* P14.2 family containing 14 putative monooxygenases that is fully conserved and intact in *M. leprae* (Grosset and Cole, 2001). It is therefore likely that this particular monooxygenase plays an important physiological function in the mycobacteria and may thus constitute an interesting target for the development of new drugs against diseases such as tuberculosis and leprosy.

## **Experimental procedures**

### ***Bacterial strains and growth conditions***

All strains were grown aerobically at 37 °C. All cloning steps were performed in *E. coli* XL1-Blue (Stratagene). The *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth (Life Technologies) in the presence or absence of 1.5 % agar (Difco). The mycobacterial strains

were grown in Sauton medium (Sauton, 1912) supplemented with 0.001 % ZnSO<sub>4</sub> and 0.25 % Triton WR1339 (Sigma) or in M7H11 agar supplemented with 10 % oleic-albumin-dextrose-catalase enrichment (Becton Dickinson and Co). *M. smegmatis*, and *M. bovis* BCG 1173P2 were transformed as described previously (Wards and Collins, 1996). Large-scale cultures of mycobacteria were grown to mid-log phase (36 h for *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155; 11-16 days for *M. bovis* BCG). When appropriate, the antibiotics (Sigma) were added to the media at the following concentrations: Kanamycin at 20 µg/ml, Ampicillin at 100 µg/ml, Hygromycin at 50 µg/ml, Streptomycin at 20 µg/ml and Gentamycin at 15 µg/ml. After growth, the bacteria were harvested, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stored at -20 °C until further use.

### ***Plasmids and DNA manipulation***

All DNA manipulations were performed using standard protocols, as described by Sambrook and Russell (Sambrook and Russell, 2001). For ligation, the Fast-Link<sup>TM</sup> DNA ligation kit (Epicentre Technologies) was used.

Construction of pBSh-*lacZ* – The 3.678-kb *Bam*HI-*Bgl*III fragment containing the ORF coding for β-galactosidase was isolated from pQEGM (Antoine *et al.*, 2000) and inserted into pBSh-D (Picardeau *et al.*, 2000) beforehand digested with *Bam*HI.

Construction of pBSh-P<sub>*ethA*</sub>-*lacZ* – The promoter region P<sub>*ethA*</sub> was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers O-161: 5'-CCAGCGGACGGTCCTCTAGAAGGTTC-3', O-162: 5'-GTGAGATCTCATGGATCCACGCTATCAAGGTAA-3'. The PCR product was inserted into pCR2.1Topo (Invitrogen) to yield pCR2.1-P<sub>*ethA*</sub>(2+4). The plasmid was re-digested with *Xba*I and *Bgl*III and the 191-bp fragment containing P<sub>*ethA*</sub> was inserted into pBSh-*lacZ*, previously digested with *Xba*I and *Bam*HI to yield pBSh-P<sub>*ethA*</sub>-*lacZ*.

Plasmids for the bacterial two-hybrid assay – The region coding for EthR was amplified by PCR using primers O-243: 5'-CTGCAGTGACCACCTCCGCGGCCAG-3' and O-244: 5'-GGTACCTTATCTGTTCTCGCCGTAA-3'. The amplified sequence was cleaved by *Pst*I and *Asp*718, and inserted into *Pst*I – *Asp*718 restricted pT25 (Karimova *et al.*, 1998) to yield pT25-EthR. Alternatively, the same chromosomal region was amplified by PCR using primers O-240: 5'-GGTACCGACTACTTCCGCAGCCAGTCA-3' and O-242: 5'-AAGCTTTCGCCGTAAATGCTGGTCA-3', cleaved by *Hind*III and *Asp*718, and inserted into pT18 (Karimova *et al.*, 1998) previously digested with the same enzymes to

yield pT18-EthR. A cyclase-deficient *E. coli* strain (DHP1) (Karimova *et al.*, 1998) was cotransformed with the two plasmids. The ability of the resulting clones to ferment maltose was assessed at 30°C on freshly prepared M9 minimal media agar plates containing 1 % maltose as unique carbon source and 40 µg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal, Promega).

### ***Beta-galactosidase assays***

The β-galactosidase activities of the recombinant *M. smegmatis* and *M. bovis* BCG strains were detected on M7H11 agar plates supplemented with 100 µg/ml X-gal. The β-galactosidase activities were quantified in liquid cultures, using a method adapted from Miller (Miller, 1972). Briefly, transformed mycobacterial cells were grown in 50 ml Sauton medium to an optical density (OD) at 600 nm of 0.6. The cells were then harvested by centrifugation (4000 x g, 15 min, 4 °C), and the pellets were washed and re-suspended in 1 ml PBS. After sonication of the bacterial suspensions, aliquots of the lysates were incubated with orthonitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG, Sigma) at 30 °C. The enzymatic reaction was followed spectrophotometrically at A<sub>420nm</sub>, and the initial velocity was calculated using the linear proportion of the kinetic curve. The β-galactosidase Specific Activity was determined as follows :  $SA = (\Delta A_{420 \text{ nm}}/\text{min})/(\text{OD}_{600 \text{ nm}} \times \text{l of culture})$ . Triplicate samples were measured for each bacterial clone. To evaluate the potential influence of ETH on the repressor activity of EthR, *M. smegmatis* co-transformed with pBSh-P<sub>ethA</sub>-lacZ and pMV261-ethR was grown to an OD<sub>600 nm</sub> of 0.3. Various concentrations of ETH (0-10-20-40 µg/ml) were then added to culture (in duplicates), and the β-galactosidase activities were measured every 10 min during 1 hour.

### ***Production and purification of His<sub>6</sub>-EthR***

The DNA coding for EthR was amplified by PCR using *M. tuberculosis* H37Rv chromosomal DNA as template and oligonucleotides O-183: 5'-CATATGACCACCTCCGCGGCCAGT-3' and O-184: 5'-GGATCCGAGCACCCCGACCGAGT-3' as primers. The PCR product was inserted into pCR2.1Topo (Invitrogen) to generate pCR2.1-ethR. The EthR-encoding fragment was sequenced on both strands and then isolated from pCR2.1-ethR by digestion with *NdeI* and *BamHI*, and inserted into pET-15b (Novagen), yielding pET-15b-ethR. This plasmid encodes

EthR containing an amino-terminal tag with the following sequence : MGSSH<sub>6</sub>SSGLVPRGSHM and was introduced into *E. coli* BL21(DE3). *E. coli* BL21(DE3)(pET-15b-*ethR*) was grown in 100 ml LB broth to an OD<sub>600 nm</sub> of 0.6-0.7. Isopropylthiogalactoside (IPTG) was then added to a final concentration of 1 mM, and the culture was grown for an additional 3 hours. The cells were then harvested by centrifugation at 12,000 x g at 4 °C, resuspended in 10 ml of lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, pH 7.5, 10 mM imidazole) and lysed by two passages through a French Pressure cell at 6.2 x 10<sup>6</sup> Pa. After centrifugation (20,000 x g, 25 min, 4 °C), the supernatant was recovered, and His<sub>6</sub>-EthR was separated from the whole-cell lysate using Ni-NTA agarose chromatography (Qiagen). After extensive washing with lysis buffer, His<sub>6</sub>-EthR was eluted from the resin with 100 mM imidazole in lysis buffer and dialysed overnight against lysis buffer. Approximately 900 µg/ml of purified protein was obtained as determined by using the Bio-Rad protein assay kit. Protein purity was determined by Coomassie blue staining after SDS-PAGE on a 12 % polyacrylamide gel. The purified protein was stored in 10 % glycerol at -20 °C and dialysed before use.

### ***Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)***

The 191-bp PCR fragment obtained using oligonucleotides O-161 and O-162 and containing the promoter region of *ethA* was purified by agarose gel electrophoresis and labelled with 10 µCi of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol; Amersham Biosciences) using T4 polynucleotide kinase (10 Units, Invitrogen). The radiolabelled fragment ([<sup>32</sup>P]-P<sub>*ethA*</sub>) was purified using a MicroSpin G-25 Column (Amersham Biosciences). [<sup>32</sup>P]-P<sub>*ethA*</sub> (100,000 counts per min; c.p.m.) was incubated for 10 min at room temperature with varying quantities of His<sub>6</sub>-EthR in a 20-µl reaction volume containing 1 µg of poly(dI-dC) (Amersham Biosciences) and 2 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 0.2 mM DTT, 10 % glycerol and 0.01 % non-ionic detergent P40 (Igepal CA-630, Sigma). After incubation, the mixture was loaded onto a non-denaturing 10 % polyacrylamide gel, and subjected to electrophoresis. The gel was then vacuum dried and exposed overnight to Biomax radiographic film (Kodak).

EMSA competitions were performed as described (Tang *et al.*, 2001). Unlabelled P<sub>*ethA*</sub> and the unlabelled Streptomycin-resistance cassette of pHP45Ω (Frey and Krisch, 1985) (in 0 to 1000-fold molar excess) were pre-incubated as specific and non-specific competitor DNA, respectively, with His<sub>6</sub>-EthR for 10 min at room temperature, followed by

the addition of the labelled probe and incubation for 10 min at room temperature. The resulting DNA-Protein complexes were then subjected to electrophoresis and autoradiography as described above.

### ***Gel Filtration***

A 94-bp DNA fragment overlapping  $P_{ethA}$  was amplified by PCR using *M. tuberculosis* H37Rv chromosomal DNA as the template and O-270: 5'-CGGTCATGGATCCACGCTATCAAC-3' and O-272: 5'-GGAGGTGGTCACCCTGGCAGC-3' as primers. Various amounts of His<sub>6</sub>-EthR were mixed with 6.7 µg (0.108 nmoles) of the PCR product in buffer A (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5; 250 mM NaCl) and filtered on a Superdex 200 HR 10/30 column connected to an AKTA FPLC system (Amersham Biosciences) at a flow rate of 0.3 ml/min. Relative concentrations of protein and DNA in the eluent were monitored by measuring the absorbency at 280 nm and 260 nm. The apparent molecular mass of His<sub>6</sub>-EthR in the absence of DNA was estimated using a standard curve of  $V_e/V_0$  versus the log of the molecular masses of standard proteins (Ribonuclease A, 13.7 kDa ; Chymotrypsinogen A, 25 kDa ; Ovalbumin, 45 kDa ; Albumin, 66 kDa ; Aldolase, 158 kDa ; Catalase, 232 kDa ; Apoferritin, 440 kDa ; Thyroglobulin, 669 kDa - Molecular size standards for gel filtration of proteins - Amersham Biosciences).  $V_0$  is the void volume and  $V_e$  is the elution volume.

### ***Surface Plasmon Resonance (SPR) binding assay***

The BIAcore2000<sup>®</sup> apparatus (BIAcore<sup>®</sup> AB, Uppsala, Sweden) was used for real-time analysis of molecular interactions between His<sub>6</sub>-EthR and the *ethA* promoter region.

Four DNA fragments were obtained by PCR using *M. tuberculosis* H37Rv chromosomal DNA as template. A 106-bp fragment (Fig. 4A; IG-106) overlapping the *ethA-R* intergenic region was obtained using O-270: 5'-CGGTCATGGATCCACGCTATCAAC-3' and O-271: 5'-Biotin-CTGACTGGCCGCGGAGGTGGT-3'. A 62-bp DNA fragment (IG-62) overlapping the 55-bp region identified by the DNase I footprinting assays was amplified using O-248: 5'-Biotin-GATCCACGCTATCAACGTA-3' and O-250: 5'-CTACGTGTCGATAGTGTCG-3'. A 37-bp fragment overlapping two DR was amplified using O-255: 5'-ATCAACGTAATGTCGAG-3' and O-256: 5'-GTCGACATCTCGTTGACG-3', and cloned in pCR2.1Topo. A 104-bp biotinylated DNA

fragment (IG-37) was then obtained by PCR using O-255 and 5'-Biotin-AATTGGGCCCTCTAGATGCAT-3'. Finally, a 36-bp fragment overlapping two inverted repeats was amplified using O-253: 5'-GTAATGTCGAGGCCGTCAA-3' and O-254: 5'-ATAGTGTCGACATCTCGTT-3', and cloned in pCR2.1Topo. A 103-bp biotinylated DNA fragment (IG-36) was then obtained by PCR using O-253 and 5'-Biotin-AATTGGGCCCTCTAGATGCAT-3'. The amplified biotinylated fragments were purified on a Quiaquick column (Qiagen) and sequenced before immobilisation on a streptavidin-coupled CM5 Sensor Chip using the standard protocol provided with the Amine Coupling Kit (BIAcore®). Briefly, streptavidin was injected at 500 ng/μl in 10 mM sodium acetate (pH 3.5) for 12 min at a flow rate of 10 μl/min. The biotinylated DNA (approximately 69 kDa for the 106-bp fragment) was injected through each flow cell at 200 ng/ml to obtain a 205 Resonance Unit (RU) stable fixation to the streptavidin. The integrity and quantity of fixed DNA was controlled by a 120-s injection of 1.6 μM calf histone H1 (Sigma) at 10 μl/min. Binding of His<sub>6</sub>-EthR to the DNA was carried out at 25 °C in 0.05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.15), 0.25 M NaCl, 0.002 M MgCl<sub>2</sub>, 0.05 M KCl and 0.001 M DTT at a flow rate of 20 μl/min. His<sub>6</sub>-EthR was injected at the desired concentrations in the running buffer until equilibrium was reached. The Sensor Chip was regenerated by a 60-s injection of 0.03 % SDS. Final curves were obtained by subtraction of the signal corresponding to a flow cell functionalised with a double stranded 100-bp long irrelevant DNA fragment (-276 to -176 fragment of the human stromelysin-1 promoter). Concentration and ratio between His<sub>6</sub>-EthR (25.9 kDa) and immobilised DNA were determined using the equation:

$$n = (\alpha \text{ RU}_{\text{His}_6\text{-EthR}} / \beta \text{ RU}_{\text{DNA}}) \times (M_{r\text{DNA}} / M_{r\text{His}_6\text{-EthR}}) \text{ Eq. 1}$$

in which  $n$  is the stoichiometry of the complex, RU is the measured response (units) obtained at binding saturation, and  $M_r$  is the molecular weight.  $\alpha = 1 \text{ pg of protein bound} / \text{RU} / \text{mm}^2$  and  $\beta = 0.73 \text{ pg DNA bound} / \text{RU} / \text{mm}^2$ . These factors arise from the different molar refractive indices of DNA *versus* proteins, which translate into a different SPR response per unit concentration change (PharmaciaBiosensor 1994; Speck *et al.*, 1999). To determine the Hill coefficient and the global  $K_D$  of the interaction, a second sensorchip containing the same biotinylated PCR product was created to obtain a 100 RU stable fixation to the streptavidin. His<sub>6</sub>-EthR was injected as described above at increasing concentrations ranging from 100 nM to 2 μM to reach binding equilibrium. For each concentration, the signal at equilibrium, noted  $R_{\text{eq}}$ , was measured. The fractional saturation,  $\Theta = R_{\text{eq}}/R_{\text{max}}$ , was then calculated.  $R_{\text{max}}$  represents the maximum His<sub>6</sub>-EthR binding capacity estimated to be 225 RU in this experiment. The linear portion (from  $\Theta = 0.2$  to  $\Theta = 0.8$ ) of the Hill plot, representing

$\log\left[\frac{\Theta}{1-\Theta}\right]$  as a function of  $\log[\text{His}_6\text{-EthR}]$ , was fitted with the linear approximation of the Hill equation,  $\log\left[\frac{\Theta}{1-\Theta}\right]=K_H+n_H \log[\text{His}_6\text{-EthR}]$ .  $K_H$  and  $n_H$  represent the Hill constant and the Hill coefficient, respectively. For half saturation ( $\Theta=0.5$ ), the value of the Hill equation is zero and the global equilibrium dissociation constant ( $K_D$ ) is given by the relation  $K_D=10^{-\frac{K_H}{n_H}}$ . The same procedure and calculations were adapted and applied to fragments IG-62, IG-37 and IG-36.

### ***Primer extension analysis***

Total RNA was isolated from *M. bovis* BCG 1173P2 as previously described (Mangan *et al.*, 1997). Contaminating DNA was removed from the RNA preparation using DNase I (DNA-free™ kit, Ambion). Five pmoles of primer O-273: 5'-GCTCTTGGTCGGGCAACGGTCCTG-3' was 5' end-labelled using [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP as described above. Ten micrograms of total RNA were mixed with 2 pmoles of the labelled primer and a dNTP mix (25 nmole for each nucleotide) in a 12- $\mu$ l final volume. After annealing for 5 min at 70 °C, the mixtures were quickly chilled on ice, and 4  $\mu$ l First-Strand-Buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 75 mM KCl and 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, RNaseOut (40 U; Invitrogen)) was added. The reaction mixture was then incubated at 37 °C for 2 min before the addition of 200 U of M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; Invitrogen). The extension reaction was conducted at 37 °C for 50 min, after which the enzyme was inactivated at 70 °C for 15 min. A sequencing reaction using dideoxy chain termination with primer O-273 was run in parallel and loaded onto a 6 % polyacrylamide-8 M urea sequencing gel concomitantly to the primer extension products to determine the position of the transcriptional start site.

### ***DNase I footprinting***

DNase I protection experiments were performed essentially as described previously (Bellefontaine *et al.*, 2002; Reisenauer *et al.*, 1999). A 323-bp *Hind*III-*Sph*I fragment and a 312-bp *Xho*I-*Hind*III fragment overlapping  $P_{ethA}$  were isolated from pCR2.1- $P_{ethA}(2+4)$  (see "Plasmids and DNA manipulation"). The first fragment was end-labelled at the *Hind*III site only using 50  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (3000 Ci/mmol; Amersham Biosciences) and 5  $\mu$ l Klenow

fragment (Invitrogen). The *XhoI-HindIII* fragment was end-labelled at the *XhoI* site using the same procedure. The labelled DNA fragments (10,000 c.p.m.) were incubated with purified His<sub>6</sub>-EthR. Diluted DNase I (0.025 U, Roche) was added to each reaction mixture for 3 min at room temperature, and the reaction was then stopped with 100 µl of stop solution (200 mM NaCl, 20 mM EDTA and 10 % SDS). The DNase I digestion products were phenol extracted, ethanol precipitated and separated on a 6 % polyacrylamide-8 M urea gel. A sequencing ladder generated with universal primer and M13mp18 as template was used to identify the position of the protected region.

### **Acknowledgements**

We are indebted to Isabelle Landrieu for technical advice and C. Le Dantec for the generous gift of pBSh-D. We would also like to thank John T. Belisle for providing *M. tuberculosis* genomic DNA (TB Research Materials and Vaccine Testing contract, NIH, NIAID contract NO1 AI-75320). The work was supported by the Institut Pasteur de Lille, la région Nord – Pas de Calais and the Ministère de la Recherche. J. E.-N. had a fellowship from the Gabonese Government.



## References

- Antoine, R., Alonso, S., Raze, D., Coutte, L., Lesjean, S., Willery, E., *et al.* (2000) New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* **182**: 5902-5905.
- Aramaki, H., Sagara, Y., Kabata, H., Shimamoto, N., and Horiuchi, T. (1995a) Purification and characterization of a cam repressor (CamR) for the cytochrome P-450cam hydroxylase operon on the *Pseudomonas putida* CAM plasmid. *J Bacteriol* **177**: 3120-3127.
- Aramaki, H., Yagi, N., and Suzuki, M. (1995b) Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Eng* **8**: 1259-1266.
- Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K.S., Wilson, T., *et al.* (1994) *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**: 227-230.
- Baulard, A.R., Betts, J.C., Engohang-Ndong, J., Quan, S., McAdam, R.A., Brennan, P.J., *et al.* (2000) Activation of the Pro-drug Ethionamide Is Regulated in Mycobacteria. *J Biol Chem* **275**: 28326-28331.
- Bellefontaine, A.F., Pierreux, C.E., Mertens, P., Vandenhoute, J., Letesson, J.J., and De Bolle, X. (2002) Plasticity of a transcriptional regulation network among alpha-proteobacteria is supported by the identification of CtrA targets in *Brucella abortus*. *Mol Microbiol* **43**: 945-960.
- DeBarber, A.E., Mdluli, K., Bosman, M., Bekker, L.G., and Barry, C.E., 3rd (2000) Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 9677-9682.
- Espinal, M.A., Laszlo, A., Simonsen, L., Boulahbal, F., Kim, S.J., Reniero, A., *et al.* (2001) Global trends in resistance to antituberculosis drugs. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med* **344**: 1294-1303.
- Fersht, A. (1985) Cooperative ligand binding, allosteric interactions, and regulation. In *Enzyme structure and mechanism*. Fersht, A. (ed.): Freeman, pp. 263-292.

- Frey, J., and Krisch, H.M. (1985) Omega mutagenesis in gram-negative bacteria: a selectable interposon which is strongly polar in a wide range of bacterial species. *Gene* **36**: 143-150.
- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., and Ramos, J.L. (1997) Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 393-410.
- Godsey, M.H., Zheleznova Heldwein, E.E., and Brennan, R.G. (2002) Structural biology of bacterial multidrug resistance gene regulators. *J Biol Chem* **277**: 40169-40172.
- Gomez, M., and Smith, I. (2000) Determinants of mycobacterial gene expression. In *Molecular genetics of mycobacteria*. Hatfull, G.F. and Jacobs, W.R. (eds.) Washington, D.C.: ASM Press.
- Grkovic, S., Brown, M.H., Roberts, N.J., Paulsen, I.T., and Skurray, R.A. (1998) QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J Biol Chem* **273**: 18665-18673.
- Grkovic, S., Brown, M.H., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., and Skurray, R.A. (2001) The staphylococcal QacR multidrug regulator binds a correctly spaced operator as a pair of dimers. *J Bacteriol* **183**: 7102-7109.
- Grosset, J.H., and Cole, S.T. (2001) Genomics and the chemotherapy of leprosy. *Lepr Rev* **72**: 429-440.
- Heym, B., Honore, N., Truffot-Pernot, C., Banerjee, A., Schurra, C., Jacobs, W.R., Jr., *et al.* (1994) Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet* **344**: 293-298.
- Hillen, W., and Berens, C. (1994) Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* **48**: 345-369.
- Huffman, J.L., and Brennan, R.G. (2002) Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 98-106.
- Jenner, P.J., and Smith, S.E. (1987) Plasma levels of ethionamide and prothionamide in a volunteer following intravenous and oral dosages. *Lepr Rev* **58**: 31-37.
- Johnston, J.P., Kane, P.O., and Kibby, M.R. (1967) The metabolism of ethionamide and its sulphoxide. *J Pharm Pharmacol* **19**: 1-9.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998) A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5752-5756.

- Mahmoudi, A., and Iseman, M.D. (1993) Pitfalls in the care of patients with tuberculosis. Common errors and their association with the acquisition of drug resistance. *JAMA* **270**: 65-68.
- Mangan, J.A., Sole, K.M., Mitchison, D.A., and Butcher, P.D. (1997) An effective method of RNA extraction from bacteria refractory to disruption, including mycobacteria. *Nucleic Acids Res* **25**: 675-676.
- Miller, J.H. (1972) In *Experiments in Molecular Genetics*: Cold Spring Harbor Lab., pp. 352-355.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W., and Hinrichs, W. (2000) Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat Struct Biol* **7**: 215-219.
- PharmaciaBiosensor (1994) *BIAtchnology Handbook*. Uppsala: AmershamBiosciences.
- Picardeau, M., Le Dantec, C., and Vincent, V. (2000) Analysis of the internal replication region of a mycobacterial linear plasmid. *Microbiology* **146**: 305-313.
- Reisenauer, A., Quon, K., and Shapiro, L. (1999) The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the Caulobacter cell cycle. *J Bacteriol* **181**: 2430-2439.
- Rist, N., Grumbach, F., and Libermann, D. (1958) Experiments on the anti-tuberculous activity of alpha-ethyl-thioisonicotinamide. *Am. Rev. Tuberc. Pulmonary. Dis.* **27**: 644-654.
- Rodriguez, G.M., Voskuil, M.I., Gold, B., Schoolnik, G.K., and Smith, I. (2002) ideR, An essential gene in mycobacterium tuberculosis: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infect Immun* **70**: 3371-3381.
- Ruse, M.J., and Waring, R.H. (1991a) The effect of methimazole on thioamide bioactivation and toxicity. *Toxicol Lett* **58**: 37-41.
- Ruse, M.J., and Waring, R.H. (1991b) The metabolism of thionicotinamide in the rat. *Drug Metabol Drug Interact* **9**: 123-137.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauton, M.B. (1912) Sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux. *C R Acad Sci Paris* **155**: 860-861.

- 
- Schumacher, M.A., Miller, M.C., Grkovic, S., Brown, M.H., Skurray, R.A., and Brennan, R.G. (2001) Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* **294**: 2158-2163.
- Speck, C., Weigel, C., and Messer, W. (1999) ATP- and ADP-dnaA protein, a molecular switch in gene regulation. *EMBO J* **18**: 6169-6176.
- Tang, C.J., Chuang, C.K., Hu, H.M., and Tang, T.K. (2001) The zinc finger domain of Tzfp binds to the tbs motif located at the upstream flanking region of the Aie1 (aurora-C) kinase gene. *J Biol Chem* **276**: 19631-19639.
- Vannelli, T.A., Dykman, A., and Ortiz De Montellano, P.R. (2002) The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. *J Biol Chem* **277**: 12824-12829.
- Wards, B.J., and Collins, D.M. (1996) Electroporation at elevated temperatures substantially improves transformation efficiency of slow-growing mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **145**: 101-105.
- Waters, M.F.R. (1989) The chemotherapy of leprosy. In *The Biology of the mycobacteria. Clinical Aspects of mycobacterial disease*. Vol. 3. Ratledge, C., Stanford, J. and Grange, J.M. (eds.) London ; New York: Academic Press, pp. 405-474.
- Weaver, L.H., Kwon, K., Beckett, D., and Matthews, B.W. (2001) Corepressor-induced organization and assembly of the biotin repressor: a model for allosteric activation of a transcriptional regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6045-6050.
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., and Cole, S. (1992) The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **358**: 591-593.

## ***II.2 – Autorégulation de ethR et influence de facteurs environnementaux sur l'expression de ethR et de ethA.***

### **II.2.1 – Introduction**

L'étude réalisée et acceptée pour publication dans le journal « Molecular Microbiology » a permis de mettre en évidence le rôle de la protéine EthR. Dans cet article nous avons montré que EthR réprime directement l'expression du gène *ethA* dont le produit est capable d'oxyder l'ETH en une forme toxique pour les bacilles. EthR appartient à la famille de répresseurs TetR/CamR qui, de manière générale, ont la particularité de s'autoréguler et d'être soit activés, soit inhibés par un facteur environnemental. Ainsi, en présence de tétracycline, la protéine TetR interagit avec l'antibiotique préalablement complexé à un ion  $Mg^{2+}$ , conduisant à un changement conformationnel qui rend TetR incapable de reconnaître ses opérateurs, ce qui provoque la levée de la répression des gènes *tetA* et *tetR*.

Dans cette partie du travail, nous avons tenté d'identifier des facteurs environnementaux capables de moduler l'expression de *ethR*. La compréhension des mécanismes de régulation de *ethR* et donc indirectement de *ethA*, présente plus qu'un intérêt fondamental.

En effet, la première partie de ce travail indique qu'une expression constitutive de *ethA* comme observé chez la souche *M. bovis* BCG déficiente pour la production de EthR rend les mycobactéries hypersensibles à l'ETH. La répression permanente de l'expression d'*ethR* devrait conduire à un effet similaire, ouvrant ainsi la possibilité de diminuer les doses d'ETH prescrites aux patients tuberculeux. Les retombées cliniques seraient importantes puisque le relais de l'ETH au rang d'antituberculeux de seconde ligne est plus lié à la toxicité des doses prescrites qu'à l'efficacité de la molécule.

### **II.2.2 – Matériel et méthodes**

*Souches et conditions de croissance* – La souche *E. coli* XL1-Blue a été utilisée pour toutes les étapes de clonage et les souches *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 et *M. bovis* BCG 1173P2 ont été utilisées pour toutes les autres expériences. Les conditions de culture et de croissance

sont identiques à celles utilisées dans l'article 2. Dans les milieux de culture, les antibiotiques suivants ont été ajoutés selon les cas : kanamycine à 20 µg/ml, ampicilline à 100 µg/mg, hygromycine à 50 µg/mg, streptomycine à 20 µg/mg et gentamycine à 15 µg/ml.

*Constructions génétiques - pBSh-P<sub>ethR</sub>-lacZ* – La région promotrice du gène *ethR* (P<sub>ethR</sub>) a été amplifiée par PCR grâce aux oligonucléotides PrEthR.5 5'-TCTAGATCGCCTGCCGTCCGGTCCAG-3' et PrEthR.6 5'-AGATCTCCTGGCAGCTTACTACGTGTCGA-3' ; les sites uniques de restriction sont soulignés (*XbaI* dans PrEthR.5 et *BglII* dans PrEthR.6). Le produit de PCR a été digéré par les enzymes de restriction *XbaI* et *BglII* et le fragment de 304 pb contenant P<sub>ethR</sub> a été inséré dans le vecteur pBSh-*lacZ* préalablement digéré par *XbaI* et *BamHI*, conduisant au plasmide pBSh-P<sub>ethR</sub>-*lacZ*.

pBSh-P<sub>ethA</sub>-*lacZ* et pMV261-*ethR* – la construction de ces deux plasmides a été précédemment décrite dans l'article 2.

*Influence de facteurs environnementaux* - Afin d'évaluer l'effet de certains facteurs environnementaux sur la transcription des gènes *ethR* et *ethA*, *M. smegmatis* pBSh-P<sub>ethR</sub>-*lacZ* et *M. smegmatis* pBSh-P<sub>ethA</sub>-*lacZ* ont été cultivés en présence des composés suivants à différentes concentrations : DL-dithiothréitole (DTT, stress réductif), peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, stress oxydatif), ETH, acide citrique (stress acide) et NaCl (stress hyperosmotique). Après 5 à 6 heures d'exposition aux différents stress (correspond à une génération), les cellules ont été récoltées et l'activité β-galactosidase a été dosée.

*Dosage d'activité β-galactosidase* - Des mesures d'activité β-galactosidase ont été réalisées selon le protocole décrit dans le matériel et méthodes de l'article 2. Pour déterminer l'activité β-galactosidase de la construction pBSh-P<sub>ethR</sub>-*lacZ*, trois mesures de DO<sub>420nm</sub> à intervalle de 20 minutes ont été réalisées.

*Extension d'amorces* - Ces expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles présentées dans l'article 2 de ce manuscrit. L'oligonucléotide PrExt.ethR(+1) 5'-CAGCGGACGGTCCTCGAGAAGGTT-3' a été utilisé comme amorce afin de déterminer le point d'initiation de la transcription du gène *ethR*.

## II.2.3 – Résultats et discussion

### II.2.3a – Autorégulation de *ethR*

Les clones issus de la transformation de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 avec le plasmide pBSh-P<sub>*ethR*</sub>-*lacZ* n'acquièrent pas de coloration bleue après plusieurs semaines sur milieu M7H11 contenant du X-gal, suggérant que l'expression intrinsèque du gène *ethR* est trop faible pour être détectée dans nos conditions expérimentales.

Parallèlement, les expériences d'extension d'amorces réalisées dans les mêmes conditions que pour *ethA* (article 2) ne nous ont pas permis de déterminer le point d'initiation de la transcription du gène *ethR*. Cette observation est un argument supplémentaire appuyant l'idée que le gène *ethR* a un niveau d'expression intrinsèque très faible en conditions de laboratoire et est donc difficile à quantifier.

Dans l'article 2, nous avons montré que la protéine EthR se fixe sur un opérateur de 55 pb sur les 75 pb que compte la région intergénique *ethA-R*. Ce large opérateur s'étend du 5<sup>ème</sup> nucléotide en amont du premier codon du gène *ethA* au 16<sup>ème</sup> nucléotide en amont du premier codon du gène *ethR*, suggérant que si EthR réprime l'expression de *ethA*, l'autorépression de *ethR* est tout aussi probable.

### II.2.3b – Influence de facteurs environnementaux sur la transcription de *ethR* et de *ethA*

Les transformants *M. smegmatis* pBSh-P<sub>*ethR*</sub>-*lacZ* et *M. smegmatis* pBSh-P<sub>*ethA*</sub>-*lacZ* ont été exposés à différents stress. Le DTT, l'ETH, le pH, le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le NaCl ne semblent pas avoir d'incidence sur la transcription de *ethR* et de *ethA*.

## **CHAPITRE 3**



## Caractérisation biochimique et structurale du régulateur EthR

### III.1 – Introduction

L'objectif de cette troisième partie du travail a été la caractérisation structurale du régulateur EthR. Le travail a été mené en étroite collaboration avec le Dr Vincent Villeret et Frédéric Frénois du laboratoire de cristallographie (UMR 8525 CNRS, Institut de Biologie de Lille). La recherche de conditions optimales de cristallisation implique d'importantes quantités de protéine, généralement plusieurs dizaines de milligrammes. La production de telles quantités de protéine exige généralement le clonage puis la production chez des hôtes adaptés. La souche *E. coli* BL21(DE3) a été choisie pour la production en masse de EthR. Ce type d'expression hétérologue n'est cependant pas sans risque, car des modifications post-traductionnelles de la protéine d'intérêt chez l'hôte d'origine pourraient ne pas prendre place lors de la production chez l'hôte hétérologue. Une perte d'information structurale, voire même l'obtention d'une structure aberrante, pourraient en résulter. Afin de minimiser ce risque, la protéine EthR a été surproduite puis purifiée chez *M. smegmatis*. Le comportement électrophorétique, la capacité de fixation à l'opérateur et la masse des protéines purifiées respectivement à partir de *E. coli* et de *M. smegmatis* ont été comparées avant d'entreprendre les études cristallographiques.

### III.2 – Matériel et méthodes

*Souches et conditions de cultures* - Dans cette étude les souches utilisées sont : *E. coli* XL1-Blue pour toutes les étapes de clonage, *E. coli* BL21(DE3) pour la production de His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ec</sub> et *M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 pour la production de His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ms</sub>. Les souches *E. coli* XL1-Blue et *E. coli* BL21(DE3) ont été cultivées sur milieu LB sans ou avec agar (1,5 %). Pour la croissance de *M. smegmatis*, nous avons utilisé du Sauton comme milieu liquide et du M7H11 complété avec de l'OADC à 10 % comme milieu solide. Dans les milieux de culture, les antibiotiques adéquats ont été ajoutés : kanamycine à 20 µg/ml, ampicilline à 100 µg/mg et chloramphénicol à 30 µg/mg.

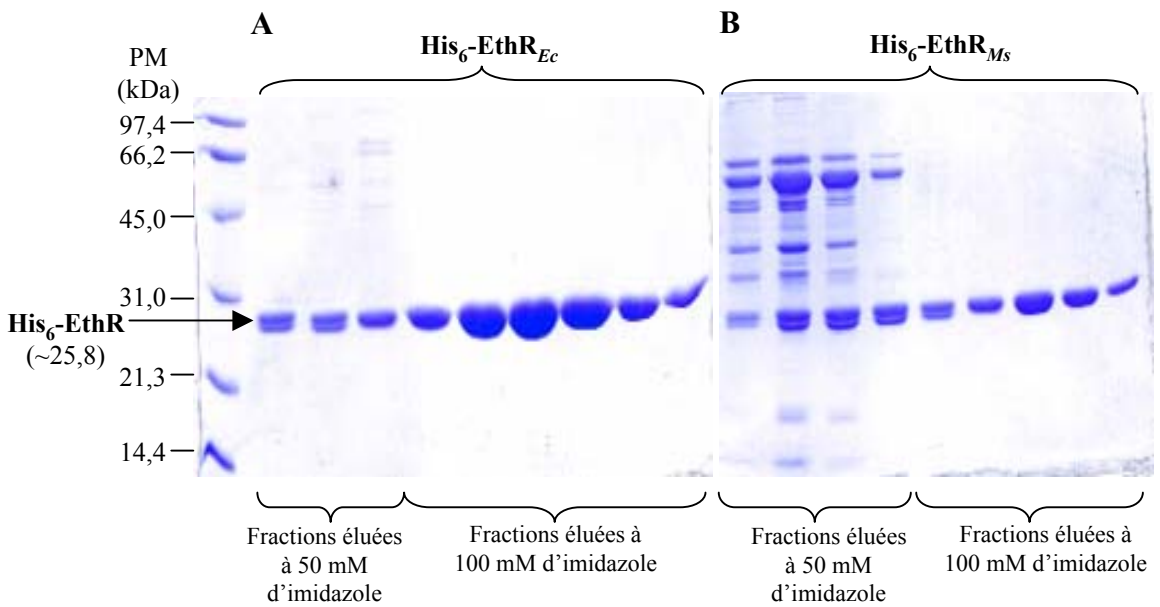
*Constructions plasmidiques* – Pour produire la version mycobactérienne de la protéine EthR recombinante, le gène correspondant a été cloné dans le vecteur

mycobactérien pMV261. La séquence de *ethR* qui a été clonée contient à son extrémité 5' une séquence codant une queue polyhistidine, permettant la purification de la protéine sur colonne de nickel. La séquence nucléotidique codant la protéine recombinante His<sub>6</sub>-EthR a été amplifiée par PCR en utilisant le plasmide pET-15b-*ethR* comme matrice d'ADN (construction décrite dans l'article 2) et les oligonocléotides pET15b-*ethR*/3 (5'-CTTCCTTTCGGGCTTTGTTAGCA-3') et pET15b-*ethR*/4 (5'-GCAGCAGCCATCATCATCATCACAGC-3') comme amorces. La PCR a été réalisée grâce à la Vent polymérase (BioLabs). Le produit de PCR a ensuite été digéré par l'enzyme de restriction *Bam*HI puis cloné dans le vecteur pMV261 préalablement coupé par *Msc*I et *Bam*HI, conduisant ainsi au plasmide pMV261-his<sub>6</sub>*ethR*. Dans cette construction, la transcription du gène *ethR* est sous la dépendance du promoteur fort et constitutif P<sub>hsp60</sub>.

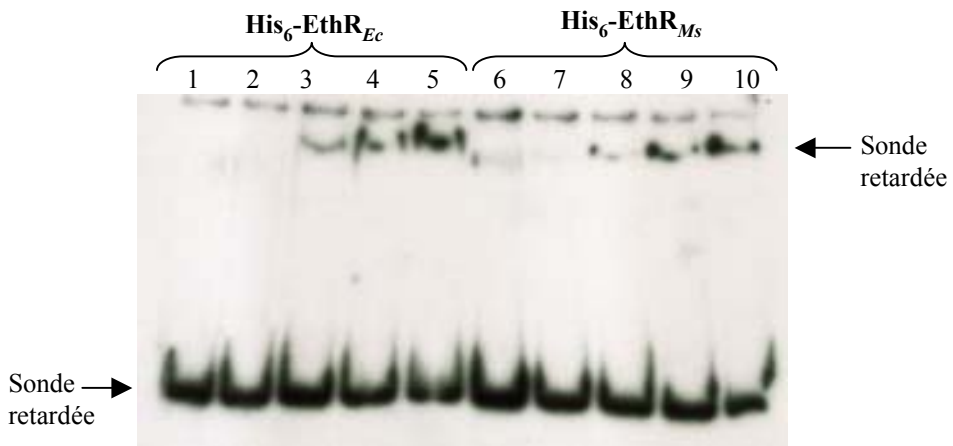
*Production et purification de la protéine EthR recombinante* – La production et la purification de His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ec</sub> ont été décrites dans l'article précédent. *M. smegmatis* pMV261-his<sub>6</sub>*ethR* a été cultivé en milieu Sauton. A DO<sub>600nm</sub> = 0,8 ou 1, les cellules ont été récoltées après centrifugation (9000 x g) puis reprises dans du tampon phosphate (1/10 du volume initial ; 50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM de NaCl). Les mycobactéries ainsi récoltées ont été lysées à la Presse de French à 6.2 x 10<sup>6</sup> Pa. Après centrifugation à 20000 x g, le surnageant a été filtré sur un filtre Millipore (0,22 µm, Millex<sup>®</sup>-GS) puis il a été passé sur colonne d'agarose Ni-NTA pour la purification de His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ms</sub>.

*Spectrométrie de masse* - Après purification des protéines EthR recombinantes (His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ec</sub> et His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ms</sub>), chaque forme de la protéine (environ 1 pmole) a été mélangée avec une solution fraîche d'acide sinapinique (10 mg/ml d'acide sinapinique dissout dans 50 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide trifluoroacétique) puis une goutte du mélange a été séchée sur une plaque métallique servant à accueillir l'échantillon. Les échantillons ont ensuite été analysés en spectrométrie de masse MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight). Les spectres de masse ont été obtenus suite à une accélération des particules à 25 kV sur un délai de 750 ns. L'appareil a été calibré avec de la myoglobine (16952 Da). Etant donné que la masse de EthR recombinante est plus importante que celle de la myoglobine, ses ions double et triple ont été utilisés pour la détermination de la masse.

Dans un deuxième temps, les deux formes recombinantes de EthR (His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ec</sub> et His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ms</sub>) ont été soumises à une digestion trypsique. Les peptides issus de la protéolyse



**Figure 18** : Gel de polyacrylamide (12 %) de la protéine recombinante EthR purifiée sur une colonne de nickel-agarose. A, His<sub>6</sub>-EthR produite chez *E. coli*. B, His<sub>6</sub>-EthR produite chez *M. smegmatis*.



**Figure 19** : Retard de migration électrophorétique du fragment d'ADN ( $P_{ethA}$ ) sur gel de polyacrylamide (12 %). Chaque puits contenait  $\sim 1,7$  ng d'ADN marqué au  $^{32}P$ . Puits 1 et 6, absence de protéine ; puits 2 et 7, 63 ng de protéine ; puits 3 et 8, 126 ng de protéine ; puits 4 et 9, 252 ng de protéine ; puits 5 et 10, 504 ng de protéine.

ont été purifiés en chromatographie liquide haute performance puis analysés en spectrométrie de masse Maldi-Tof (25 kV ; T, 90 ns).

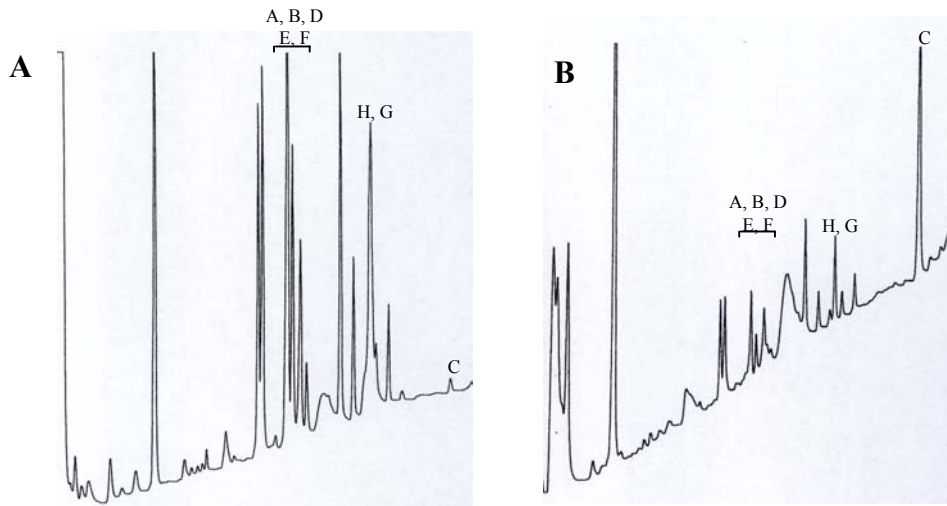
### ***III.3 – Résultats et discussion***

*Production et purification de EthR recombinante* – Dans pMV261-his<sub>6</sub>ethR, l'expression du gène codant EthR est sous la dépendance d'un promoteur mycobactérien fort et constitutif. Par contre, l'expression de ethR au départ de pET-15b-ethR est sous la dépendance d'un promoteur inductible à l'IPTG. La figure 18B met en exergue la forme mycobactérienne de EthR recombinante tandis que la figure 18A montre EthR produite chez *E. coli*. Les fractions de EthR recombinante récoltées à 50 mM d'imidazole apparaissent fortement contaminées pour la forme mycobactérienne, alors que la contamination est moindre pour la forme produite chez *E. coli*. Par contre, à 100 mM d'imidazole, la protéine récoltée présente un niveau de pureté acceptable, aussi bien chez *M. smegmatis* que chez *E. coli*. Pour un même volume de culture, le rendement de la production de EthR est nettement plus élevé chez *E. coli* (>100 mg/l) que chez *M. smegmatis* (<10 mg/l). Ce résultat confirme la difficulté que représente la production de protéines recombinantes en hôte génétiquement non-adapté.

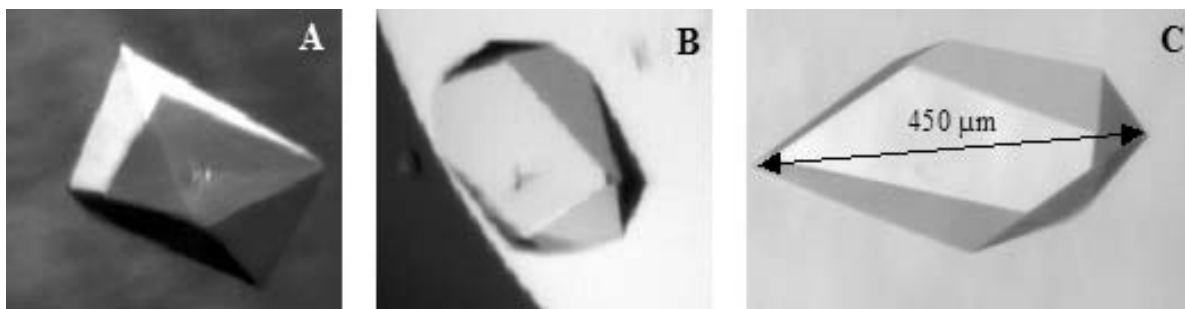
*Test de fixation à l'ADN des deux versions de EthR* – La propriété de fixation des protéines recombinantes His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ec</sub> et His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ms</sub> à l'ADN a été évaluée par des expériences de retard sur gel similaires à celles décrites dans l'article 2. Les résultats indiquent que les deux formes possèdent la même capacité de fixation sur la région opératrice du promoteur P<sub>ethA</sub>. A concentration donnée, les proportions relatives d'ADN retardé et non-retardé sont comparables indépendamment de la source de production de la protéine recombinante, suggérant que les protéines recombinantes His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ec</sub> et His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ms</sub> sont fonctionnellement équivalentes (figure 19).

*Spectrométrie de masse comparative* – Les mesures de masse réalisées sur les protéines recombinantes His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ec</sub> et His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ms</sub> entières ont permis de conclure que ces deux formes ont une masse identique.

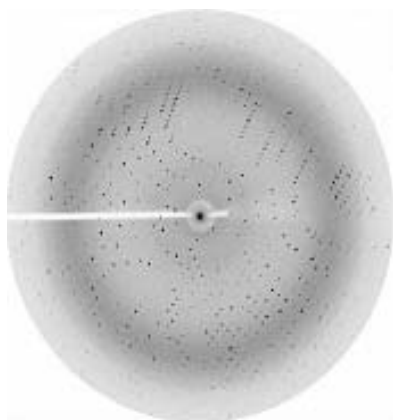
Parallèlement, l'analyse comparative des masses de fragments protéiques issus de la digestion trypsique des 2 protéines recombinantes n'a pas permis de détecter de différence



**Figure 20** : Profile de purification de His<sub>6</sub>-EthR suite à une digestion trypsique. A, pics représentant les peptides issus de la digestion trypsique de His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ec</sub>. B, pics représentant les peptides issus de la digestion trypsique de His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ms</sub>. Peptides indiqués par des lettres (A-H), voir tableau 3).



**Figure 21** : Cristaux du régulateur EthR. EthR concentrée à 60 mg/ml a été cristallisée en présence d'agents cristallins constitués comme suit : A, 100 mM de Tris pH 6,1 ; 0,3 M de d'acétate de sodium ; 15 % de PEG 4000. B, 100 mM de Tris pH 5,9 ; 0,3 M de d'acétate de sodium ; 15 % de PEG 4000. C, 85 mM de cacodylate de sodium pH 6,5 ; 0,17 M de sulfate d'ammonium ; 15 % de glycérol ; 25,5 % de PEG 8000.



**Figure 22** : Cliché de diffraction d'un cristal de EthR obtenu en présence 85 mM de cacodylate de sodium pH 6,5 ; 0,17 M de sulfate d'ammonium ; 15 % de glycérol ; 25,5 % de PEG 8000. Les données ont été collectées à 100 °K grâce à une générateur à anode tournante Nonius composé d'un détecteur mar345 dtb équipé d'une optique *osmic* (Institut de biologie de Lille, UMR 8525, V. Villeret et F. Frénois).

His<sub>6</sub>-EthR

Digest Used: Trypsin

1	11	21	31	41	51	61	71
GSSHHHHHS	SGLVPRGSHM	T TSAASQASL	PRGRR TARPS	GDDRELAILA	TAENLLEDRP	LADISVDDLA	KGAGISRPTF
81	91	101	111	121	131	141	151
YFYFPSKEAV	LLTLLDRVNV	QADMALQTLA	ENPADTDREN	MWRTGINVFF	ETFGSHKAVT	RAGQAARATS	VEVAELWSTF
161	171	181	191	201	211	221	231
MQKWIAYTAA	VIDAERDRGA	APRTLPAHEL	ATALNLMNER	TLFASFAGEQ	PSVPEARVLD	TLVHIWVTSI	YGENR

	Start	End	m/z (mi)	m/z (av)	Missed Cleavages	Sequence
	142	147	573.3109	573.6336	0	(R) AGQAAR (A)
	119	123	735.3248	735.8452	0	(R) ENMWR (T)
	177	183	742.3960	742.8180	1	(R) DRGAAPR (T)
	36	44	974.4655	975.0123	0	(R) TARPSGDDR (E)
	138	147	1000.5652	1001.1407	1	(K) AVTRAGQAAR (A)
	35	44	1130.5667	1131.2009	1	(R) RTARPSGDDR (E)
A	88	97	1142.6785	1143.3776	0	(K) EAVLLTLLDR (V)
	164	176	1478.7644	1479.6865	0	(K) WIAYTAAVIDAER (D)
B	124	137	1583.7858	1584.7832	0	(R) TGINVFFETFGSHK (A)
	17	32	1601.7706	1602.7775	0	(R) GSHMTTSAASQASLPR (G)
	164	178	1749.8924	1750.9643	1	(K) WIAYTAAVIDAERDR (G)
C	1	16	1768.8493	1769.8946	0	(-) GSSHHHHHSSGLVPR (G)
	201	217	1806.9026	1808.0136	0	(R) TLFASFAGEQPSVPEAR (V)
	17	34	1814.8932	1816.0184	1	(R) GSHMTTSAASQASLPRGR (R)
	148	163	1826.8999	1828.1075	0	(R) ATSVEVAELWSTFMQK (W)
D	72	87	1837.9277	1839.1173	0	(K) GAGISRPTFYFYFPSK (E)
E	184	200	1893.9857	1895.2018	0	(R) TLPANELATALNLMNER (T)
	124	141	2011.0401	2012.2903	1	(R) TGINVFFETFGSHKAVTR (A)
	218	235	2115.1239	2116.4403	0	(R) VLDTLVHIWVTSIYGENR (-)
	98	118	2272.0879	2273.4993	0	(R) VVNQADMALQTLAENPADTDR (E)
	119	137	2300.0922	2301.6051	1	(R) ENMWRTGINVFFETFGSHK (A)
	179	200	2346.2352	2347.7188	1	(R) GAAPRTLPAHELATALNLMNER (T)
	142	163	2381.1924	2382.7178	1	(R) AGQAARATSVEVAELWSTFMQK (W)
	45	71	2908.5519	2910.3124	0	(R) ELAILATAENLLEDRPLADISVDDLAK (G)
F	72	97	2961.5878	2963.4716	1	(K) GAGISRPTFYFYFPSKEAVLLTLLDR (V)
G	98	123	2988.3944	2990.3212	1	(R) VVNQADMALQTLAENPADTDRENMWR (T)
	148	176	3286.6458	3288.7708	1	(R) ATSVEVAELWSTFMQKWIAYTAAVIDAER (D)
	1	32	3351.6014	3353.6488	1	(-) GSSHHHHHSSGLVPRGSHMTTSAASQASLPR (G)
	88	118	3395.7481	3397.8536	1	(K) EAVLLTLLDRVNVNADMALQTLAENPADTDR (E)
	184	217	3681.8699	3684.1921	1	(R) TLPANELATALNLMNERTLFASFAGEQPSVPEAR (V)
H	36	71	3863.9991	3866.3013	1	(R) TARPSGDDRELAILATAENLLEDRPLADISVDDLAK (G)
	201	235	3903.0081	3905.4306	1	(R) TLFASFAGEQPSVPEARVLDTLVHIWVTSIYGENR (-)
	45	87	4727.4612	4730.4064	1	(R) ELAILATAENLLEDRPLADISVDDLAKGAGISRPTFYFYFPSK (E)

**Tableau 3** : digestion trypsique théorique de His<sub>6</sub>-EthR. Les lettres de la 1<sup>ère</sup> colonne indiquent les peptides identiques lors de l'analyse Maldi-tof (cf. figure 20) pour His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ec</sub> et His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ms</sub>.

MS-Digest 3.3.1, ProteinProspector 3.4.1

© Copyright (1995-2000) The Regents of the University of California.

de masse. Les peptides identifiés communément pour les deux formes assurent une couverture de 80 % de la séquence de EthR. (figure 20A et 20B).

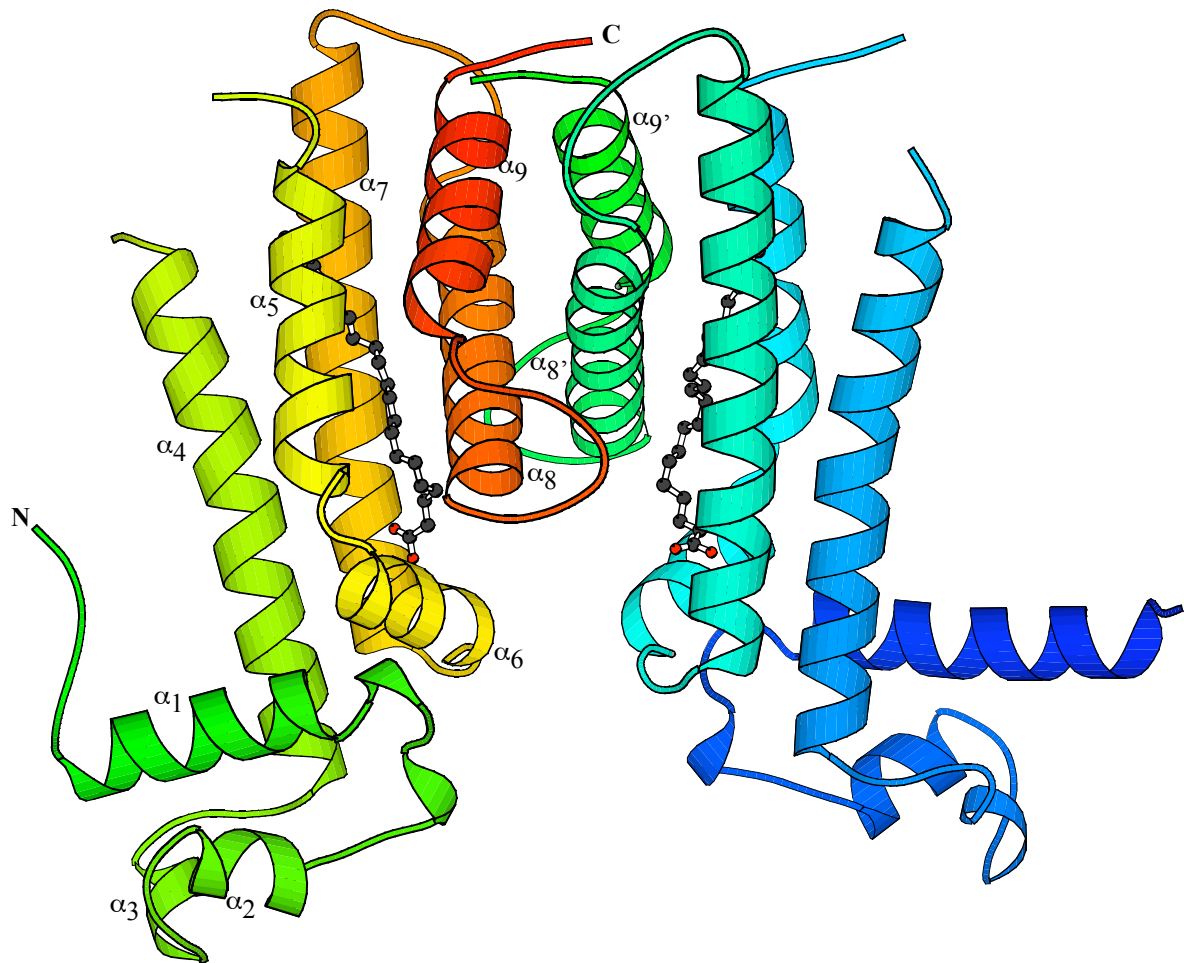
Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent que les formes recombinantes His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ec</sub> et His<sub>6</sub>-EthR<sub>Ms</sub> sont identiques, et suggèrent que EthR ne subit pas de modification post-traductionnelle covalente chez les mycobactéries. Nous avons donc entrepris l'étude de la structure cristallographique de la protéine recombinante purifiée de *E. coli*.

*Cristallogénèse et diffraction des cristaux aux rayons X* – D'importantes quantités de EthR ont été produites chez *E. coli* BL21(DE3) transformée avec la construction plasmidique pET-15b-*ethR* selon le même protocole que celui décrit dans l'article 2. Le régulateur a été purifié par affinité sur colonne de nickel-agarose. La protéine a été purifiée avec un rendement supérieur à 100 mg par litre de culture bactérienne.

Les expériences de cristallogénèse ont été réalisées par Frédéric Frénois et ont permis l'obtention de cristaux qui sont représentés sur la figure 21. Le cristal de 450 µm de long obtenu dans les conditions de cristallisation indiquées à la figure 21C a été soumis aux rayonnements d'un diffractomètre à rayon X (Générateur à anode tournante Nonius possédant un détecteur mar345 dtb équipé d'une optique osmic) à l'Institut de biologie de Lille. Les données ont été collectées à 100 °K, soit -0,366 °C. La figure 22 représente le cliché de diffraction du cristal analysé. Ce cristal décrit une maille à symétrie orthorhombique dont les paramètres sont les suivants : a = 57,57 Å, b = 85,94 Å, c = 100,41 Å, α = β = γ = 90 °C.

*Marquage et phasage de His<sub>6</sub>-EthR* - Afin de définir le phasage de la protéine dans le réseau cristallin défini, nous avons procédé à un remplacement des méthionines du régulateur EthR par des méthionines marquées au sélénium (SeMet). L'analyse comparative en spectrométrie de masse de la forme non marquée de EthR (25790,4 Da) et de la forme sélénée (26016,6 Da) révèle une différence de masse de 226,2 Da correspondant approximativement à la masse de 6 atomes de sélénium.

Après congélation des cristaux de His<sub>6</sub>-EthR sélénées, des jeux de données de diffraction ont été collectés à l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility – Grenoble ; ID29). La diffraction des cristaux réalisée à la longueur d'onde d'absorption du sélénium (λ = 0,98 Å) a permis de définir et de phaser la structure de la protéine cristallisée.



**Figure 23** : Structure de EthR.



L'analyse révèle que EthR cristallise sous forme dimérique et symétrique. Le régulateur EthR a une structure très semblable à celle des membres de la famille TetR/CamR. La structure de EthR est particulièrement homologue à celle de QacR du fait d'une part du nombre d'hélices  $\alpha$  de la protéine et d'autre part de l'agencement spatial de ces hélices (Schumacher *et al.*, 2001). Chaque monomère contient 9 hélices  $\alpha$  (figure 23). Dans la région amino-terminale, les hélices  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  constituent le domaine hélice-tour-hélice de reconnaissance de l'ADN. Elles représentent également la région de EthR qui présente l'homologie structurale la plus significative avec les membres de la famille TetR/CamR (Grkovic *et al.*, 2002). Les hélices  $\alpha_4$  à  $\alpha_9$  forment le corps dimérisable de la protéine. L'interaction entre les monomères se fait au niveau de la région C-terminale, entre les hélices  $\alpha_8$  et  $\alpha_9$  de la première sous-unité et les hélices  $\alpha_8'$  et  $\alpha_9'$  de la seconde sous-unité (figure 23). EthR a la particularité de posséder un canal hydrophobe formé par les hélices  $\alpha_5$ - $\alpha_7$ - $\alpha_8$ - $\alpha_9$ .

De façon surprenante, l'analyse du cristal a également révélé la présence d'une molécule non-covalamment liée à chaque protéine du dimère. Cette molécule dont la structure précise restera à définir se présente comme une longue chaîne aliphatique hydrophobe d'environ 20 carbones, vrillée dans le profond canal hydrophobe formé par les hélices  $\alpha_5$ - $\alpha_7$ - $\alpha_8$ - $\alpha_9$  de chaque monomère.

Il serait intéressant dans le cadre de travaux à venir de réaliser des expériences de mutagenèse dirigée sur la région hydrophobe de EthR impliquée dans la formation du canal afin de vérifier si l'absence de cette structure influencerait l'efficacité de reconnaissance et de fixation de EthR à son opérateur. De plus, des expériences de co-cristallisation du régulateur avec son opérateur permettraient la résolution du complexe EthR-ADN. La mise à jour de la structure du complexe EthR-ADN est une information essentielle pour orienter la recherche des inhibiteurs de l'activité de fixation à l'ADN du régulateur.

# **DISCUSSION GENERALE**

## Discussion générale et perspectives

L'éthionamide (ETH), analogue structural de l'isoniazide (INH), est un antituberculeux de seconde ligne utilisé pour traiter des patients tuberculeux infectés par des souches de *M. tuberculosis* résistant à plusieurs drogues de première ligne ou pour traiter des personnes immuno-déprimées infectées par les mycobactéries non-tuberculeuses telles que *M. ulcerans*, *M. leprae* et *M. marinum*.

L'ETH et l'INH sont deux puissants antituberculeux capables d'inhiber la biosynthèse des acides mycoliques (Schroeder *et al.*, 2002), constituants essentiels de la paroi mycobactérienne. L'INH empêche la biosynthèse des acides mycoliques via l'inhibition de l'énoyl-AcpM réductase (InhA) impliquée dans le système FAS-II (*fatty acid synthase type II*). D'autre part, diverses mutations dans *inhA* provoquent la résistance à l'INH, mais aussi à l'ETH. Bien que cette expérience permette de conclure que *inhA* constitue une cible commune aux deux antibiotiques, elle n'exclut pas l'existence d'autres cibles de l'ETH.

A l'origine de ce travail, le Docteur Alain Baulard avait pour but d'identifier des cibles moléculaires de l'ETH. Le test phénotypique consistait à transformer une banque cosmétique de *M. tuberculosis* chez *M. smegmatis* puis de sélectionner des clones résistants à l'ETH. Cette expérience devait favoriser la croissance sur ETH de bactéries transformées porteuses de copies supplémentaires de cibles d'ETH, ainsi avantagées par un effet de dosage génique. Le résultat inattendu de cette expérience est à l'origine de ce travail de thèse : certains clones issus de la transformation se sont avérés résistants à l'ETH parce qu'ils surproduisent Rv3855, une protéine de la famille des régulateurs transcriptionnels de la famille TetR/CamR.

L'objet de la première partie de notre étude a été de comprendre le rôle du gène *Rv3855* dans la résistance à l'ETH.

L'analyse de la région environnante du gène *Rv3855* a révélé la présence d'une phase ouverte de lecture distante de seulement 75 pb et codée en sens opposé. La recherche d'homologues dans « Genbank » indique que l'enzyme Rv3854c codée par ce gène appartient à la famille de monooxygénases à FAD (flavine adénine di-nucléotide).

L'ETH ainsi que les autres thioamides sont des composés sulfurés connus pour être des substrats de monooxygénases à FAD (FMO) et monooxygénases à cytochrome P-450 (Ruse & Waring, 1991 ; Ruse & Waring, 1991). Il a également été montré que l'ETH est métabolisé dans les microsomes de rats par une enzyme hépatique NADPH-dépendante et que l'oxydation *in vitro* de l'ETH conduit à des intermédiaires électrophiles (S-oxydes) capables de s'associer de manière covalente avec des protéines nucléophiles (Dyroff & Neal, 1981). Le métabolisme de l'ETH par les FMO au niveau du foie est à l'origine de nécroses hépatiques observées chez des patients tuberculeux traités à l'ETH. Le traitement préalable au méthimazole, un inhibiteur spécifique des monooxygénases à FAD, réduit le développement des troubles hépatiques.

Une série d'expériences a été entreprise afin

1. de comprendre le rôle de *Rv3855* dans la résistance à l'ETH
2. de déterminer si *Rv3854c* joue un rôle dans cette résistance
3. d'identifier s'il y a une interconnexion entre ces deux gènes ou leurs produits.

Dans le premier manuscrit, nous montrons qu'une surproduction de la protéine *Rv3854c* conduit à une forte augmentation de la sensibilité de *M. smegmatis* et de *M. bovis* BCG à l'ETH. Ce phénotype a ensuite été corrélé à une diminution proportionnelle de la synthèse des acides mycoliques de type  $\alpha$  et céto. En accord avec les prédictions informatiques, cette expérience suggère que *Rv3854c* (rebaptisé *ethA*) code une enzyme capable d'activer l'ETH en une forme bactériotoxique qui se traduit par la diminution de la synthèse de certains des acides mycoliques impliqués dans l'élaboration de la paroi mycobactérienne.

Inversement, et conformément au phénotype original d'identification des clones résistants à l'ETH, la surexpression du gène *Rv3855* à l'aide d'un plasmide multicopie et d'un promoteur fort confirme l'implication de ce gène dans la résistance à l'ETH. Dans ce cas, l'analyse informatique propose le classement de *Rv3855* dans le groupe des régulateurs transcriptionnels de la famille TetR/CamR caractérisés par leur site de fixation à l'ADN de type hélice-tour-hélice localisé dans la portion amino-terminale de la protéine. Considérant ces données, le gène *Rv3855* a été rebaptisé *ethR*, en accord avec son rôle probable dans la régulation de la synthèse de EthA.

Une étude récente a confirmé que EthA catalyse deux étapes au cours du métabolisme de l'ETH. EthA transformerait d'abord l'ETH en ETH S-oxyde, forme qui

serait à son tour oxydée par la même enzyme en 2-éthyl-4-amidopyridine (Vannelli *et al.*, 2002).

Lorsque l'ETH est administré à des patients tuberculeux ou à des personnes infectées par des mycobactéries opportunistes, l'ETH pourrait donc être activé à la fois par les monooxygénases hépatiques et par EthA. Il serait intéressant de déterminer la part de contribution de l'enzyme mycobactérienne (EthA) et des FMO hépatiques sur l'activation de l'ETH et des autres thioamides afin de comprendre l'impact de EthA sur l'efficacité de l'éthionamide *in vivo* et de synthétiser des molécules dérivées de l'ETH agissant selon le même mode d'action mais avec plus d'efficacité et moins de toxicité.

Soulignons que *ethA* et *ethR* sont également présents chez *M. leprae* et *M. avium*. Les gènes *ethA* et *ethR* présentent la même organisation structurale chez *M. avium* et chez *M. tuberculosis*. Par contre, ces deux gènes ne sont pas situés sur le même locus chez *M. leprae*. Contrairement à beaucoup d'autres gènes de *M. leprae*, *ethA* et *ethR* ne sont pas tronqués et ont un fort pourcentage de similarité avec leurs orthologues chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*. Dans le génome de *M. tuberculosis*, environ 30 gènes codent des monooxygénases potentielles et la participation de certaines de ces enzymes dans le processus d'oxydation de l'ETH reste possible.

Dans une étude indépendante, Debarber et collaborateurs ont montré que des mutations dans *ethA* identifiées dans des souches cliniques se traduisent par une importante résistance à l'ETH (DeBarber *et al.*, 2000). Aucune mutation n'a été observée dans la zone régulatrice ou dans EthR.

Un autre mécanisme de résistance à l'ETH indépendant des mutations dans *ethA* et *inhA* a été mis en évidence très récemment dans une souche de laboratoire. Rawat *et al.* ont identifié un mutant transpositionnel de *M. smegmatis* incapable de produire du mycothiol et présentant un phénotype de résistance à l'ETH (Rawat *et al.*, 2003). Le mycothiol, ou 1-O-(2-[N-acetyl-L-cysteinyl]amido-2-deoxy- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-D-myco-inositol est un composé essentiel pour la défense des mycobactéries contre le stress oxydatif. Cependant, aucune hypothèse n'a encore pu être avancée quant au rôle de ces composés dans la résistance à l'ETH.

Les études génétiques réalisées dans la première partie de notre thèse suggèrent que l'expression du gène codant la monooxygénase EthA est sous le contrôle de EthR. La deuxième partie de la thèse a consisté à identifier formellement les inter-relations entre EthR et EthA.

Avant de résumer l'expérimentation réalisée dans ce cadre, il est à noter que des expériences de spectrométrie de masse montrent que la protéine EthR produite chez *E. coli* présente une masse moléculaire et un profil de digestion trypsique identiques à ceux de la protéine produite chez *M. smegmatis*. Ces résultats suggèrent que EthR ne subit pas de modification post-traductionnelle au sens strict, ce qui, pour des raisons pratiques, nous a encouragé à étudier les propriétés de EthR purifiée à partir de souches recombinantes d'*E. coli*.

Le clonage du promoteur du gène *ethA* ( $P_{ethA}$ ) en amont du gène rapporteur *lacZ* dépourvu de ses propres signaux de transcription et de traduction a permis de montrer que l'expression en *trans* de *ethR* provoque la répression transcriptionnelle du gène *ethA*.

Dans un second temps, des expériences de retard sur gel d'électrophorèse ont permis de montrer que EthR interagit directement et spécifiquement avec la séquence nucléotidique  $P_{ethA}$ .

Troisièmement, nous avons réalisé des expériences d'empreintes à la DNase I afin de déterminer la région de fixation du régulateur EthR sur son opérateur. Ces expériences ont révélé que EthR se fixe sur une zone longue de 55 pb sur les 75 pb que compte la région intergénique *ethA-R*. Cette observation suggère que EthR se fixe de manière multimérique sur son opérateur. Le régulateur EthR semble avoir un comportement original puisque la plupart des membres de la famille TetR/CamR interagissent avec un opérateur d'environ 15 pb. Ce comportement est cependant en partie comparable à celui du régulateur QacR qui module négativement l'expression du gène *qacA* codant un transporteur transmembranaire chez *Staphylococcus aureus*. Pour sa part, QacR fixe un opérateur de 28 pb (Grkovic *et al.*, 1998), donc environ le double de la moyenne des opérateurs des membres de la famille. La cristallisation de QacR lié à son opérateur a récemment permis de comprendre ce phénomène. La protéine QacR se fixe sous forme tétramérique (deux homodimères) sur son opérateur (Grkovic *et al.*, 1998), protégeant ainsi une zone globalement deux fois plus importante que pour le dimère TetR.

Les masses moléculaires de EthR et de QacR sont voisines, soit respectivement 23,7 kDa et 23 kDa. Il est intéressant de noter qu'avec ses 55 pb, l'opérateur de EthR couvre une zone d'ADN qui fait approximativement le double de celle couverte par QacR. Ces observations nous ont ainsi conduit à émettre l'hypothèse que la fixation de EthR sur l'ADN pourrait impliquer 8 unités protéiques.

Nous avons tenté de vérifier cette hypothèse par une approche originale impliquant la résonance plasmonique de surface (RPS). Classiquement, cette technique a été utilisée pour

suivre la cinétique d'interaction entre protéines, ou la cinétique de fixation de protéines sur l'ADN. Dans notre étude, nous avons étudié la cinétique de saturation de molécules d'opérateurs par EthR puis nous en avons déduit la stœchiométrie de fixation à l'équilibre. Ces analyses ont confirmé que 8 molécules de EthR se fixent sur l'opérateur. En outre, la saturation du site est rapidement atteinte à partir d'un certain seuil de concentration en protéine. L'équation de la droite de régression générée à partir des courbes de cinétique de fixation de EthR sur son opérateur a permis de déterminer le coefficient de Hill et révèle une valeur de 3,46 indiquant une forte propension de EthR à s'associer à l'ADN de façon coopérative. En outre, des analyses en filtration sur gel confirment qu'un large excès en quantité de protéine par rapport à l'opérateur est nécessaire pour observer un pic de molécules de EthR libres, indiquant que l'opérateur requiert une grande quantité de répresseur pour saturer la zone de fixation à l'ADN. Le mécanisme proposé de fixation de type coopératif est d'ailleurs en accord avec les expériences d'empreintes à la DNase I montrant que le répresseur ne protège la région opératrice de 55 pb qu'à partir d'un certain seuil de concentration de la protéine, et qu'au delà de ce seuil, la même région de 55 pb est protégée, sans jamais observer de fixation non spécifique du régulateur sur l'ADN.

Nous avons confirmé par Résonance Plasmonique de Surface que la région identifiée par des analyses d'empreintes à la DNase I correspond à la zone de fixation d'un homooctamère de EthR. Cette région contient deux longues séquences répétées directes ou DR (*direct repeat*) probablement impliquées dans l'interaction avec le répresseur. En effet, un fragment d'ADN restreint à cette région conserve le caractère coopératif de la fixation, mais avec une stœchiométrie plus faible (une moyenne de 4,5 molécule de EthR/molécule d'ADN), tandis qu'un décalage vers la droite de 7 pb conduit à une forte réduction de la capacité de fixation de EthR sur l'ADN, suggérant que les deux DRs sont essentielles pour la fixation de deux dimères de EthR qui par la suite induisent la fixation coopérative des autres molécules de EthR sur les sites secondaires de la région de 55 pb.

Des analyses d'extension d'amorces ont révélé un site unique d'initiation de la transcription du gène *ethA* situé dans la région opératrice protégée par EthR. En outre, comme la région intergénique *ethA-R* est très étroite, cela implique un probable chevauchement entre les promoteurs des gènes *ethA* et *ethR*, et entre l'opérateur et les promoteurs. Le chevauchement entre le promoteur et le site de fixation du régulateur nous amène à penser que l'interaction de l'ARN polymérase avec les promoteurs de *ethA* et de *ethR* est empêchée par la fixation du répresseur EthR sur la région intergénique. Cette

organisation structurale de la région intergénique *ethA-R* n'est pas sans rappeler la topologie de la région intergénique *tetA-R* et ses 81 pb de long (Hillen & Berens, 1994).

Nos expériences soulignent une importante diversité de comportements des membres de la familles TetR/CamR. Ainsi, si les deux membres de référence que sont TetR et CamR se fixent sur leurs opérateurs sous forme dimérique (Aramaki *et al.*, 1995 ; Hillen & Berens, 1994), deux homodimères de QacR et 8 molécules de EthR se fixent sur leurs opérateurs respectifs (Grkovic *et al.*, 2001). Une question fondamentale subsistait à ce stade du travail : alors que TetR, CamR et QacR se présentent tous sous forme de dimères quand ils ne sont pas liés à l'ADN, qu'en est-il de EthR ?

Dans notre second manuscrit, une série d'évidences indirectes ont été obtenues sur la structure quaternaire de EthR non-fixé à l'ADN. Dans un premier temps, les expériences de filtration sur gel ont suggéré que *in vitro*, même à forte concentration, EthR n'est pas préalablement assemblé sous une forme multimérique en absence de la séquence nucléotidique. Cependant, cette technique ne nous a pas semblé suffisamment résolutive pour choisir entre un état monomérique et un état dimérique de EthR en solution. C'est pourquoi nous avons entrepris d'évaluer la capacité d'interaction entre monomères de EthR *in vivo*, mais en absence de l'opérateur. Des expériences de double-hybride bactérien (BACTH) ont permis de mettre en évidence des interactions entre monomères de EthR. Pris ensemble, les résultats de gel filtration et de BACTH suggèrent que EthR pourrait adopter une conformation dimérique quand il n'est pas fixé sur l'opérateur. A noter enfin que les expériences de RPS suggèrent qu'un nombre pair de EthR se fixe à l'opérateur, que celui-ci soit entier (8), ou tronqué (4 ou 6).

Plusieurs travaux ont montré que la surexpression de *ethA* induit une augmentation de la sensibilité des mycobactéries à l'éthionamide (Baulard *et al.*, 2000 ; DeBarber *et al.*, 2000 ; Vannelli *et al.*, 2002). Parallèlement, nous avons montré que dans les conditions de laboratoire, un mutant *M. bovis* BCG déficient pour la production du répresseur EthR présente également un phénotype d'hypersensibilité à l'éthionamide. Ces observations suggèrent que dans les conditions de laboratoire, *ethA* est partiellement réprimé. Il est d'ailleurs probable que la sensibilité des mycobactéries à l'ETH soit modulée par des molécules restant à identifier et qui influencent la fonction régulatrice de EthR ou l'expression de son gène. Cette idée n'est pas nouvelle dans la famille TetR/CamR. En effet, il a été montré qu'en présence de tétracycline, TetR est capable d'interagir physiquement avec le complexe tétracycline-Mg (Orth *et al.*, 2000). Cette interaction TetR-tétracycline



conduit à un changement conformationnel du régulateur qui devient incapable de reconnaître son opérateur, entraînant ainsi la levée de la répression de la transcription du gène *tetA*. Le même mécanisme a été observé pour le régulateur QacR. En présence d'ammoniums quaternaires, le régulateur QacR interagit avec ces molécules, puis par changement conformationnel QacR perd sa capacité à reconnaître son opérateur et il s'ensuit la levée de la répression de *qacA*. Cependant, la présence d'ETH dans le milieu de culture n'interfère pas avec l'activité « répresseur » de EthR. Parallèlement nous n'avons détecté aucune influence d'autres facteurs tels que le DTT, l'acidité, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ou le chlorure de sodium sur la transcription de *ethR* et de *ethA*.

Les constructions plasmidiques utilisées pour l'étude de EthR et de sa fixation à l'ADN ont été exploitées afin de produire des quantités de EthR recombinante suffisantes pour entreprendre son étude cristallographique. Les cristaux obtenus décrivent une maille de symétrie orthorhombique et révèlent que EthR possède une structure quaternaire dimérique quand il n'est pas lié à l'ADN. Cette confirmation des résultats indirects obtenus dans la deuxième partie du travail met en lumière une propriété commune à l'ensemble des membres caractérisés de la famille TetR/CamR. De nombreux parallélismes structurels entre EthR et QacR peuvent être soulignés. L'analyse détaillée du cristal fera l'objet de la thèse de Doctorat de Frédéric Frenois. Seules les grandes caractéristiques de la structure seront présentées ici. Chez les membres de la famille TetR, les domaines conservés de liaison à l'ADN ( domaine HTH) sont connectés à des domaines spécifiques des ligands respectifs, ce qui implique de faibles homologies entre les domaines des différents membres. Il est donc surprenant d'observer que les structures tertiaires et quaternaires de QacR et de EthR soient globalement comparables. En effet, les deux structures présentent le même type de symétrie. Les monomères contiennent 9 hélices  $\alpha$ . Les trois premières forment le domaine d'interaction à l'ADN, en particulier  $\alpha_2$  et  $\alpha_3$  qui constituent le motif HTH. Les hélices de  $\alpha_4$  à  $\alpha_9$  forment le sites de dimerisation et de fixation du ou des ligands. Comme c'est également le cas pour TetR, l'interaction entre les monomères implique 2 hélices antiparallèles carboxy-terminaux qui forment le motif de dimérisation à quatre hélices. Pour EthR comme pour QacR, ces hélices sont  $\alpha_8$  et  $\alpha_9$  alors que les hélices  $\alpha_8$  et  $\alpha_{10}$  sont à la base de la dimérisation de TetR.

Une des grandes surprises de cette analyse fut l'observation dans le cristal d'une molécule dont la structure pourrait être apparentée à celle d'un lipide linéaire de 16 à 20

atomes de carbone. Cette molécule plonge au plus profond du canal hydrophobe formé par les hélices  $\alpha 5$  à  $\alpha 9$ . Cette observation est du plus grand intérêt à plusieurs points de vue :

1 - La présence de cette molécule pourrait être à l'origine de la conformation en « pince ouverte » des HTH du dimère, conformation rappelant la forme inhibée de QacR, incapable de se fixer à l'opérateur. Il est probable que cette molécule constitue un, sinon le substrat de la monooxygénase EthA. En effet, la logique de la boucle de régulation EthR-EthA implique que le substrat de l'enzyme constitue le ligand du répresseur, sa présence en excès provoquant la dérégulation de l'enzyme, alors qu'inversement, son appauvrissement permet à EthR de retrouver sa capacité de liaison à l'ADN et donc de répression de *ethA*. Nos expériences de retard sur gel, d'empreintes à la DNase I et de RPS ont permis de localiser les probables sites de fixation de EthR à l'opérateur. Le prochain challenge des cristallographes sera l'obtention de la structure du complexe formé par le répresseur et sa cible.

2 - Inducteur de la forme potentiellement inhibée de EthR, le ligand constitue une base solide pour la conception d'inhibiteurs. De tels inhibiteurs présenteraient un double intérêt : le mutant *M. bovis* BCG déficient pour la production de EthR montre des signes clairs de perturbation de croissance. A ce titre, EthR constitue une cible thérapeutique prometteuse. En outre, chez ce même mutant, l'inhibition de l'activité de répression de EthR induit une chute drastique de la CMI pour l'ETH. Rappelons que l'exclusion de l'usage de l'ETH comme antibiotique de première ligne tient essentiellement à sa toxicité par rapport à d'autres molécules telles que l'INH. En vérité, la toxicité de l'ETH n'est que légèrement plus importante que celle de l'INH. Par contre, c'est l'usage de doses d'ETH 3 à 4 fois plus importantes que pour l'INH qui sont à l'origine des phénomènes d'hépatotoxicité. Dans une première approximation, l'inhibition de EthR pourrait permettre de réduire la CMI de l'ETH de près de 10 fois. L'association d'ETH et d'inhibiteur(s) de EthR dans un même cocktail pourrait dès lors favoriser l'usage de l'ETH comme antibiotique de première intention. Une étude menée en Italie révèle que sur 46 souches de *M. tuberculosis* résistantes à l'INH, isolées de patients tuberculeux, seules 2 souches (4,3 %) étaient également ETH-résistantes (Fattorini *et al.*, 1999). Ce résultat confirme que malgré l'existence d'une cible commune aux deux antibiotiques, les cas de résistances croisées sont peu fréquents, soulignant l'intérêt de l'élaboration de composés ancillaires de l'ETH.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

- Andersen, P. (1994).** Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun* **62**, 2536-44.
- Aramaki, H., Sagara, Y., Hosoi, M. & Horiuchi, T. (1993).** Evidence for autoregulation of *camR*, which encodes a repressor for the cytochrome P-450cam hydroxylase operon on the *Pseudomonas putida* CAM plasmid. *J Bacteriol* **175**, 7828-33.
- Aramaki, H., Sagara, Y., Kabata, H., Shimamoto, N. & Horiuchi, T. (1995).** Purification and characterization of a *cam* repressor (CamR) for the cytochrome P-450cam hydroxylase operon on the *Pseudomonas putida* CAM plasmid. *J Bacteriol* **177**, 3120-7.
- Asiedu, K., Sherpier, R. & Raviglione, M. C. (2000).** *Buruli ulcer Mycobacterium ulcerans* infection. *WHO Global Buruli ulcer initiative*. Geneva, Switzerland.: *World Health Organization*.
- Baess, I. (1979).** Deoxyribonucleic acid relatedness among species of slowly-growing mycobacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* **87**, 221-6.
- Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G. & Jacobs, W. R., Jr. (1994).** *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **263**, 227-30.
- Barksdale, L. & Kim, K. S. (1977).** *Mycobacterium*. *Bacteriol Rev* **41**, 217-372.
- Barnes, P. J. & Belvisi, M. G. (1993).** Nitric oxide and lung disease. *Thorax* **48**, 1034-43.
- Basso, L. A., Zheng, R., Musser, J. M., Jacobs, W. R., Jr. & Blanchard, J. S. (1998).** Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid-resistant clinical isolates. *J Infect Dis* **178**, 769-75.
- Baulard, A. R., Betts, J. C., Engohang-Ndong, J., Quan, S., McAdam, R. A., Brennan, P. J., Locht, C. & Besra, G. S. (2000).** Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in mycobacteria. *J Biol Chem* **275**, 28326-31.
- Bayer, R. & Wilkinson, D. (1995).** Directly observed therapy for tuberculosis: history of an idea. *Lancet North Am Ed.* **345**, 1545-8.
- Bean, A. G., Roach, D. R., Briscoe, H., France, M. P., Korner, H., Sedgwick, J. D. & Britton, W. J. (1999).** Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* **162**, 3504-11.
- Beaucher, J., Rodrigue, S., Jacques, P. E., Smith, I., Brzezinski, R. & Gaudreau, L. (2002).** Novel *Mycobacterium tuberculosis* anti-sigma factor antagonists control sigmaF activity by distinct mechanisms. *Mol Microbiol* **45**, 1527-40.
- Behr, H., Reverdy, M. E., Mabilat, C., Freney, J. & Fleurette, J. (1994).** [Relationship between the level of minimal inhibitory concentrations of five antiseptics and the presence of *qacA* gene in *Staphylococcus aureus*]. *Pathol Biol (Paris)* **42**, 438-44.
- Behr, M. A. (2002).** BCG--different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis.* **2**, 86-92.
- Belanger, A. E., Besra, G. S., Ford, M. E., Mikusova, K., Belisle, J. T., Brennan, P. J. & Inamine, J. M. (1996).** The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11919-24.

- Belisle, J. T., Vissa, V. D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P. J. & Besra, G. S. (1997).** Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**, 1420-2.
- Biet, F., Locht, C. & Kremer, L. (2002).** Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *J Mol Med* **80**, 147-62.
- Blanchard, J. S. (1996).** Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem* **65**, 215-39.
- Bloom, B. R. & Murray, C. J. (1992).** Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* **257**, 1055-64.
- Boshoff, H. I., Mizrahi, V. & Barry, C. E., 3rd (2002).** Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *J Bacteriol* **184**, 2167-72.
- Brandt, L., Elhay, M., Rosenkrands, I., Lindblad, E. B. & Andersen, P. (2000).** ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **68**, 791-5.
- Brandt, L., Feino Cunha, J., Weinreich Olsen, A., Chilima, B., Hirsch, P., Appelberg, R. & Andersen, P. (2002).** Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun* **70**, 672-8.
- Brosch, R., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Garnier, T. & Cole, S. T. (2000).** Comparative genomics of the leprosy and tubercle bacilli. *Res Microbiol* **151**, 135-42.
- Brosch, R., Pym, A. S., Gordon, S. V. & Cole, S. T. (2001).** The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends Microbiol* **9**, 452-8.
- Bryk, R., Griffin, P. & Nathan, C. (2000).** Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **407**, 211-5.
- Bryskier, A. & Lowther, J. (2002).** Fluoroquinolones and tuberculosis. *Expert Opin Investig Drugs* **11**, 233-58.
- Chan, J., Fan, X. D., Hunter, S. W., Brennan, P. J. & Bloom, B. R. (1991).** Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun* **59**, 1755-61.
- Chan, J., Tian, Y., Tanaka, K. E., Tsang, M. S., Yu, K., Salgame, P., Carroll, D., Kress, Y., Teitelbaum, R. & Bloom, B. R. (1996).** Effects of protein calorie malnutrition on tuberculosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14857-61.
- Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R. S. & Bloom, B. R. (1992).** Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* **175**, 1111-22.
- Chang, C. S. & Chang, K. P. (1986).** Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of leishmania-macrophage binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 100-4.
- Chatterjee, D., Lowell, K., Rivoire, B., McNeil, M. R. & Brennan, P. J. (1992).** Lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. Capping with mannosyl residues in some strains. *J Biol Chem* **267**, 6234-9.
- Chen, L., Xie, Q. W. & Nathan, C. (1998).** Alkyl hydroperoxide reductase subunit C (AhpC) protects bacterial and human cells against reactive nitrogen intermediates. *Mol Cell* **1**, 795-805.
- Chen, P., Ruiz, R. E., Li, Q., Silver, R. F. & Bishai, W. R. (2000).** Construction and characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the alternate sigma factor gene, sigF. *Infect Immun* **68**, 5575-80.

- Choi, K. H., Kremer, L., Besra, G. S. & Rock, C. O. (2000).** Identification and substrate specificity of beta -ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **275**, 28201-7.
- Chopra, I. & Brennan, P. (1997).** Molecular action of anti-mycobacterial agents. *Tuber Lung Dis* **78**, 89-98.
- Colditz, G. A., Brewer, T. F., Berkey, C. S., Wilson, M. E., Burdick, E., Fineberg, H. V. & Mosteller, F. (1994).** Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* **271**, 698-702.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., 3rd, Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Barrell, B. G. & et al. (1998).** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**, 537-44.
- Collins, D. M., Kawakami, R. P., de Lisle, G. W., Pascopella, L., Bloom, B. R. & Jacobs, W. R., Jr. (1995).** Mutation of the principal sigma factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8036-40.
- Coninx, R., Mathieu, C., Debacker, M., Mirzoev, F., Ismaelov, A., de Haller, R. & Meddings, D. R. (1999).** First-line tuberculosis therapy and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in prisons. *Lancet* **353**, 969-73.
- Daffe, M. & Draper, P. (1998).** The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**, 131-203.
- Daffe, M. & Etienne, G. (1999).** The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber Lung Dis* **79**, 153-69.
- Daley, C. L. & Griffith, D. E. (2002).** Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. *Clin Chest Med* **23**, 623-32, vii.
- Daley, C. L., Small, P. M., Schecter, G. F., Schoolnik, G. K., McAdam, R. A., Jacobs, W. R., Jr. & Hopewell, P. C. (1992).** An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med* **326**, 231-5.
- David, H. L., Rastogi, N., Clavel-Seres, S., Clement, F. & Thorel, M. F. (1987).** Structure of the cell envelope of *Mycobacterium avium*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* **264**, 49-66.
- Davidson, P. T. & Le, H. Q. (1992).** Drug treatment of tuberculosis--1992. *Drugs* **43**, 651-73.
- De Voss, J. J., Rutter, K., Schroeder, B. G. & Barry, C. E., 3rd (1999).** Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *J Bacteriol* **181**, 4443-51.
- DeBarber, A. E., Mdluli, K., Bosman, M., Bekker, L. G. & Barry, C. E., 3rd (2000).** Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9677-82.
- Dedonder, R. (1966).** Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.* **8**, 500-505.
- DeMaio, J., Zhang, Y., Ko, C., Young, D. B. & Bishai, W. R. (1996).** A stationary-phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2790-4.
- Deng, L., Mikusova, K., Robuck, K. G., Scherman, M., Brennan, P. J. & McNeil, M. R. (1995).** Recognition of multiple effects of ethambutol on metabolism of mycobacterial cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 694-701.
- Donald, P. R., Schoeman, J. F. & O'Kennedy, A. (1987).** Hepatic toxicity during chemotherapy for severe tuberculosis meningitis. *Am J Dis Child* **141**, 741-3.

- Doukhan, L., Predich, M., Nair, G., Dussurget, O., Mandic-Mulec, I., Cole, S. T., Smith, D. R. & Smith, I. (1995).** Genomic organization of the mycobacterial sigma gene cluster. *Gene* **165**, 67-70.
- Draper, P. (1982).** The anatomy of mycobacteria. In *The Biology of mycobacteria*, pp. 9-52. Edited by C. Ratledge & J. Stanford.
- Durbach, S. I., Andersen, S. J. & Mizrahi, V. (1997).** SOS induction in mycobacteria: analysis of the DNA-binding activity of a LexA-like repressor and its role in DNA damage induction of the recA gene from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **26**, 643-53.
- Dussurget, O., Rodriguez, M. & Smith, I. (1996).** An ideR mutant of *Mycobacterium smegmatis* has derepressed siderophore production and an altered oxidative-stress response. *Mol Microbiol* **22**, 535-44.
- Dussurget, O., Timm, J., Gomez, M., Gold, B., Yu, S., Sabol, S. Z., Holmes, R. K., Jacobs, W. R., Jr. & Smith, I. (1999).** Transcriptional control of the iron-responsive fxbA gene by the mycobacterial regulator IdeR. *J Bacteriol* **181**, 3402-8.
- Dyroff, M. C. & Neal, R. A. (1981).** Identification of the major protein adduct formed in rat liver after thioacetamide administration. *Cancer Res* **41**, 3430-5.
- Edwards, P., Nelsen, J. S., Metz, J. G. & Dehesh, K. (1997).** Cloning of the fabF gene in an expression vector and in vitro characterization of recombinant fabF and fabB encoded enzymes from *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **402**, 62-6.
- Ehrt, S., Shiloh, M. U., Ruan, J., Choi, M., Gunzburg, S., Nathan, C., Xie, Q. & Riley, L. W. (1997).** A novel antioxidant gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* **186**, 1885-96.
- Espinal, M. A., Kim, S. J., Suarez, P. G., Kam, K. M., Khomenko, A. G., Migliori, G. B., Baez, J., Kochi, A., Dye, C. & Raviglione, M. C. (2000).** Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries. *JAMA* **283**, 2537-45.
- Farmer, P. & Kim, J. Y. (1998).** Community based approaches to the control of multidrug resistant tuberculosis: introducing "DOTS-plus". *BMJ* **317**, 671-4.
- Fattorini, L., Iona, E., Ricci, M. L., Thoresen, O. F., Orru, G., Oggioni, M. R., Tortoli, E., Piersimoni, C., Chiaradonna, P., Tronci, M., Pozzi, G. & Orefici, G. (1999).** Activity of 16 antimicrobial agents against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Drug Resist* **5**, 265-70.
- Fernandes, N. D. & Kolattukudy, P. E. (1996).** Cloning, sequencing and characterization of a fatty acid synthase- encoding gene from *Mycobacterium tuberculosis* var. bovis BCG. *Gene* **170**, 95-9.
- Fiss, E. H., Yu, S. & Jacobs, W. R., Jr. (1994).** Identification of genes involved in the sequestration of iron in mycobacteria: the ferric exochelin biosynthetic and uptake pathways. *Mol Microbiol* **14**, 557-69.
- Flesselles, B., Anand, N. N., Remani, J., Loosmore, S. M. & M.H., K. (1999).** Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **177**, 237-42.
- Gazzard, B. (2001).** Tuberculosis, HIV and the developing world. *Clin Med* **1**, 62-8.
- Gelber, R. H. (1994).** Chemotherapy of lepromatous leprosy: recent developments and prospects for the future. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**, 942-52.
- Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Franken, K. L., Drijfhout, J. W., D'Souza, S., Necker, A., Huygen, K. & Ottenhoff, T. H. (2000).** Identification of major epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* AG85B that are recognized by HLA-A\*0201-restricted CD8+ T cells in HLA- transgenic mice and humans. *J Immunol* **165**, 6463-71.

- Gomez, M., Doukhan, L., Nair, G. & Smith, I. (1998).** sigA is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **29**, 617-28.
- Gonzalez-Juarrero, M., Turner, O. C., Turner, J., Marietta, P., Brooks, J. V. & Orme, I. M. (2001).** Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **69**, 1722-8.
- Good, C. (1992).** The genus mycobacteria - Medical. In *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.*, pp. 1214-1237. Edited by A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. Springer Verlag, New-York.
- Goodfellow, M. & Wayne, L. G. (1982).** Taxonomy and Nomenclature. In *The biology of the mycobacteria*, pp. 471-521. Edited by C. R. a. J. Stanford. London: Academic Press.
- Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Garnier, T., Brosch, R., Parkhill, J., Barrell, B., Cole, S. T. & Hewinson, R. G. (2001).** Genomics of *Mycobacterium bovis*. *Tuberculosis* **81**, 157-63.
- Gralla, J. D. (1996).** Activation and repression of *E. coli* promoters. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 526-30.
- Grkovic, S., Brown, M. H., Roberts, N. J., Paulsen, I. T. & Skurray, R. A. (1998).** QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J Biol Chem* **273**, 18665-73.
- Grkovic, S., Brown, M. H., Schumacher, M. A., Brennan, R. G. & Skurray, R. A. (2001).** The staphylococcal QacR multidrug regulator binds a correctly spaced operator as a pair of dimers. *J Bacteriol* **183**, 7102-9.
- Grkovic, S., Brown, M. H. & Skurray, R. A. (2002).** Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 671-701.
- Grumbach, F., Canetti, G., Grosset, J. & le Lirzin, M. (1967).** Late results of long-term intermittent chemotherapy of advanced, murine tuberculosis: limits of the murine model. *Tubercle* **48**, 11-26.
- Haldenwang, W. G. (1995).** The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev* **59**, 1-30.
- Hamid, M. E., Roth, A., Landt, O., Kroppenstedt, R. M., Goodfellow, M. & Mauch, H. (2002).** Differentiation between *Mycobacterium farcinogenes* and *Mycobacterium senegalense* strains based on 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol* **40**, 707-11.
- Harth, G. & Horwitz, M. A. (1999).** Export of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* superoxide dismutase is dependent upon both information in the protein and mycobacterial export machinery. A model for studying export of leaderless proteins by pathogenic mycobacteria. *J Biol Chem* **274**, 4281-92.
- Havlir, D. V. & Barnes, P. F. (1999).** Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **340**, 367-73.
- Helmann, J. D. (2002).** The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. *Adv Microb Physiol* **46**, 47-110.
- Henriques, B., Hoffner, S. E., Petrini, B., Juhlin, I., Wahlen, P. & Kallenius, G. (1994).** Infection with *Mycobacterium malmoeense* in Sweden: report of 221 cases. *Clin Infect Dis* **18**, 596-600.
- Heym, B., Alzari, P. M., Honore, N. & Cole, S. T. (1995).** Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, katG, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **15**, 235-45.
- Heym, B., Stavropoulos, E., Honore, N., Domenech, P., Saint-Joanis, B., Wilson, T. M., Collins, D. M., Colston, M. J. & Cole, S. T. (1997).** Effects of overexpression of



- the alkyl hydroperoxide reductase AhpC on the virulence and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **65**, 1395-401.
- Hillas, P. J., del Alba, F. S., Oyarzabal, J., Wilks, A. & Ortiz De Montellano, P. R. (2000). The AhpC and AhpD antioxidant defense system of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **275**, 18801-9.
- Hillen, W. & Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* **48**, 345-69.
- Hinrichs, W., Kisker, C., Duvel, M., Muller, A., Tovar, K., Hillen, W. & Saenger, W. (1994). Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. *Science* **264**, 418-20.
- Horwitz, M. A., Harth, G., Dillon, B. J. & Maslesa-Galic, S. (2000). Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13853-8.
- Horwitz, M. A., Lee, B. W., Dillon, B. J. & Harth, G. (1995). Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1530-4.
- Hu, C., Mayadas-Norton, T., Tanaka, K., Chan, J. & Salgame, P. (2000). *Mycobacterium tuberculosis* infection in complement receptor 3-deficient mice. *J Immunol* **165**, 2596-602.
- Huffman, J. L. & Brennan, R. G. (2002). Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr Opin Struct Biol* **12**, 98-106.
- Hwang, B. J., Yeom, H. J., Kim, Y. & Lee, H. S. (2002). *Corynebacterium glutamicum* utilizes both transsulfuration and direct sulfhydrylation pathways for methionine biosynthesis. *J Bacteriol* **184**, 1277-86.
- Ingram, C. W., Tanner, D. C., Durack, D. T., Kernodle, G. W., Jr. & Corey, G. R. (1993). Disseminated infection with rapidly growing mycobacteria. *Clin Infect Dis* **16**, 463-71.
- Iseman, M. D., Cohn, D. L. & Sbarbaro, J. A. (1993). Directly observed treatment of tuberculosis. We can't afford not to try it. *N Engl J Med* **328**, 576-8.
- Jackson, M., Phalen, S. W., Lagranderie, M., Ensergueix, D., Chavarot, P., Marchal, G., McMurray, D. N., Gicquel, B. & Guilhot, C. (1999). Persistence and protective efficacy of a *Mycobacterium tuberculosis* auxotroph vaccine. *Infect Immun* **67**, 2867-73.
- Jenkins, P. A., Pattyn, S. R. & Portaels, F. (1982). Diagnostic bacteriology. In *The Biology of the mycobacteria*, pp. 441-470. Edited by C. Ratledge & J. Stanford.
- Kamath, A. T., Feng, C. G., Macdonald, M., Briscoe, H. & Britton, W. J. (1999). Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **67**, 1702-7.
- Kampelmann, F. (1970). Results of monotherapy with Isoxyl in untreated pulmonary tuberculosis cases of different difficulties and Isoxyl in routine-therapy. *Antibiot Chemother* **16**, 96-104.
- Kaufmann, S. H. & van Embden, J. D. (1993). Tuberculosis: a neglected disease strikes back. *Trends Microbiol* **1**, 2-5.
- Khoo, K. H., Douglas, E., Azadi, P., Inamine, J. M., Besra, G. S., Mikusova, K., Brennan, P. J. & Chatterjee, D. (1996). Truncated structural variants of lipoarabinomannan in ethambutol drug-resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. Inhibition of arabinan biosynthesis by ethambutol. *J Biol Chem* **271**, 28682-90.

- Kilburn, J. O. & Takayama, K. (1981).** Effects of ethambutol on accumulation and secretion of trehalose mycolates and free mycolic acid in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **20**, 401-4.
- Kinoshita, H., Ipposhi, H., Okamoto, S., Nakano, H., Nihira, T. & Yamada, Y. (1997).** Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol* **179**, 6986-93.
- Kleinschmidt, C., Tovar, K. & Hillen, W. (1991).** Computer simulations and experimental studies of gel mobility patterns for weak and strong non-cooperative protein binding to two targets on the same DNA: application to binding of tet repressor variants to multiple and single tet operator sites. *Nucleic Acids Res* **19**, 1021-8.
- Koga, H., Aramaki, H., Yamaguchi, E., Takeuchi, K., Horiuchi, T. & Gunsalus, I. C. (1986).** camR, a negative regulator locus of the cytochrome P-450cam hydroxylase operon. *J Bacteriol* **166**, 1089-95.
- Koga, H., Yamaguchi, E., Matsunaga, K., Aramaki, H. & Horiuchi, T. (1989).** Cloning and nucleotide sequences of NADH-putidaredoxin reductase gene (camA) and putidaredoxin gene (camB) involved in cytochrome P-450cam hydroxylase of *Pseudomonas putida*. *J Biochem (Tokyo)* **106**, 831-6.
- Kojic, M., Aguilar, C. & Venturi, V. (2002).** TetR family member psrA directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. *J Bacteriol* **184**, 2324-30.
- Konno, K., Feldmann, F. M. & McDermott, W. (1967).** Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. *American Review of Respiratory Disease* **95**, 461-469.
- Kremer, L., Besra, G. S., Brennan, P. J. & Baulard, A. R. (1999).** Le lipoarabinomannane : structure et fonction d'un glycolipide impliqué dans la pathogénie tuberculeuse. *Médecine/Science* **15**, 842-850.
- Kremer, L., Douglas, J. D., Baulard, A. R., Morehouse, C., Guy, M. R., Alland, D., Dover, L. G., Lakey, J. H., Jacobs, W. R., Jr., Brennan, P. J., Minnikin, D. E. & Besra, G. S. (2000).** Thiolactomycin and related analogues as novel antimycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **275**, 16857-64.
- Kremer, L., Dover, L. G., Carrere, S., Nampoothiri, K. M., Lesjean, S., Brown, A. K., Brennan, P. J., Minnikin, D. E., Locht, C. & Besra, G. S. (2002).** Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the beta- ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* **364**, 423-30.
- Kremer, L., Dover, L. G., Morbidoni, H. R., Vilcheze, C., Maughan, W. N., Baulard, A., Tu, S. C., Honore, N., Deretic, V., Sacchettini, J. C., Locht, C., Jacobs, W. R. & Besra, G. S. (2003).** Inhibition of InhA activity, but not KasA activity, induces formation of a KasA-containing complex in mycobacteria. *J Biol Chem* **24**, 24.
- Kremer, L. S. & Besra, G. S. (2002).** Current status and future development of antitubercular chemotherapy. *Expert Opin Investig Drugs* **11**, 1033-49.
- Lacave, C., Laneelle, M. A., Daffe, M., Montrozier, H. & Laneelle, G. (1989).** Mycolic acid metabolic filiation and location in *Mycobacterium aurum* and *Mycobacterium phlei*. *Eur J Biochem* **181**, 459-66.
- Landay, A., Gartland, G. L. & Clement, L. T. (1983).** Characterization of a phenotypically distinct subpopulation of Leu-2+ cells that suppresses T cell proliferative responses. *J Immunol* **131**, 2757-61.
- Larsen, M. H., Vilcheze, C., Kremer, L., Besra, G. S., Parsons, L., Salfinger, M., Heifets, L., Hazbon, M. H., Alland, D., Sacchettini, J. C. & Jacobs, W. R., Jr. (2002).** Overexpression of inhA, but not kasA, confers resistance to isoniazid and

- ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol Microbiol* **46**, 453-66.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. & Lazdunski, A. (1996).** A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**, 1137-46.
- Lee, C. K., Kamitani, Y., Nihira, T. & Yamada, Y. (1999).** Identification and in vivo functional analysis of a virginiamycin S resistance gene (*varS*) from *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol* **181**, 3293-7.
- Lee, J. H., Wang, T., Ault, K., Liu, J., Schmitt, M. P. & Holmes, R. K. (1997).** Identification and characterization of three new promoter/operators from *Corynebacterium diphtheriae* that are regulated by the diphtheria toxin repressor (DtxR) and iron. *Infect Immun* **65**, 4273-80.
- Levin, M. E. & Hatfull, G. F. (1993).** *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Mol Microbiol* **8**, 277-85.
- Levy-Frebault, V. V. & Portaels, F. (1992).** Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 315-23.
- Li, Z., Kelley, C., Collins, F., Rouse, D. & Morris, S. (1998).** Expression of *katG* in *Mycobacterium tuberculosis* is associated with its growth and persistence in mice and guinea pigs. *J Infect Dis* **177**, 1030-5.
- Ma, X., Dou, S., Wright, J. A., Reich, R. A., Teeter, L. D., El Sahly, H. M., Awe, R. J., Musser, J. M. & Graviss, E. A. (2002).** 5' dinucleotide repeat polymorphism of NRAMP1 and susceptibility to tuberculosis among Caucasian patients in Houston, Texas. *Int J Tuberc Lung Dis* **6**, 818-23.
- MacKanness, G. B. (1956).** The intracellular activation of pyrazinamide and nicotinamid. *American Review of Tuberculosis* **74**, 718-728.
- MacMicking, J. D., North, R. J., LaCourse, R., Mudgett, J. S., Shah, S. K. & Nathan, C. F. (1997b).** Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5243-8.
- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. O. & Cronan, J. E., Jr. (1993).** Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **57**, 522-42.
- Manca, C., Paul, S., Barry, C. E., 3rd, Freedman, V. H. & Kaplan, G. (1999).** *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infect Immun* **67**, 74-9.
- Manganelli, R., Dubnau, E., Tyagi, S., Kramer, F. R. & Smith, I. (1999).** Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **31**, 715-24.
- Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K., Dubnau, E., Gomez, M. & Smith, I. (2002).** Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma(H) in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol Microbiol* **45**, 365-74.
- Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K. & Smith, I. (2001).** The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol* **41**, 423-37.
- Marsollier, L., Robert, R., Aubry, J., Saint Andre, J. P., Kouakou, H., Legras, P., Manceau, A. L., Mahaza, C. & Carbonnelle, B. (2002).** Aquatic insects as a vector for *Mycobacterium ulcerans*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4623-8.
- McDermott, W. & Tompsett, R. (1954).** Activation of pyrazinamide and nicotinamid in acidic environments in vitro. *American Review of Tuberculosis* **70**, 748-754.

- McKinney, J. D., Honer zu Bentrup, K., Munoz-Elias, E. J., Miczak, A., Chen, B., Chan, W. T., Swenson, D., Sacchetti, J. C., Jacobs, W. R., Jr. & Russell, D. G. (2000). Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**, 735-8.
- McNeil, M., Daffe, M. & Brennan, P. J. (1990). Evidence for the nature of the link between the arabinogalactan and peptidoglycan of mycobacterial cell walls. *J Biol Chem* **265**, 18200-6.
- Mdluli, K., Slayden, R. A., Zhu, Y., Ramaswamy, S., Pan, X., Mead, D., Crane, D. D., Musser, J. M. & Barry, C. E., 3rd (1998). Inhibition of a *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. *Science* **280**, 1607-10.
- Meier, I., Wray, L. V. & Hillen, W. (1988). Differential regulation of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes tetA and tetR by the tandem tet operators O1 and O2. *Embo J* **7**, 567-72.
- Menzio, F. D., Rouse, J. H., Alavi, M., Laude-Sharp, M., Muller, J., Bischoff, R., Brennan, M. J. & Locht, C. (1996). Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J Exp Med* **184**, 993-1001.
- Merrick, M., Gibbins, J. & Toukdarian, A. (1987). The nucleotide sequence of the sigma factor gene ntrA (rpoN) of *Azotobacter vinelandii*: analysis of conserved sequences in NtrA proteins. *Mol Gen Genet* **210**, 323-30.
- Michele, T. M., Ko, C. & Bishai, W. R. (1999). Exposure to antibiotics induces expression of the *Mycobacterium tuberculosis* sigF gene: implications for chemotherapy against mycobacterial persistors. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 218-25.
- Miesel, L., Weisbrod, T. R., Marcinkeviciene, J. A., Bittman, R. & Jacobs, W. R., Jr. (1998b). NADH dehydrogenase defects confer isoniazid resistance and conditional lethality in *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **180**, 2459-67.
- Miyakawa, S., Suzuki, K., Noto, T., Harada, Y. & Okazaki, H. (1982). Thiolactomycin, a new antibiotic. IV. Biological properties and chemotherapeutic activity in mice. *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 411-9.
- Mizuguchi, Y., Udou, T. & Yamada, T. (1983). Mechanism of antibiotic resistance in *Mycobacterium intracellulare*. *Microbiol Immunol* **27**, 425-431.
- Movahedzadeh, F., Colston, M. J. & Davis, E. O. (1997). Determination of DNA sequences required for regulated *Mycobacterium tuberculosis* RecA expression in response to DNA-damaging agents suggests that two modes of regulation exist. *J Bacteriol* **179**, 3509-18.
- Mueller-Ortiz, S. L., Wanger, A. R. & Norris, S. J. (2001). Mycobacterial protein HbhA binds human complement component C3. *Infect Immun* **69**, 7501-11.
- Murray, P. J., Aldovini, A. & Young, R. A. (1996). Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guerin strains that secrete cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 934-9.
- Nakada, Y., Jiang, Y., Nishijyo, T., Itoh, Y. & Lu, C. D. (2001). Molecular characterization and regulation of the aguBA operon, responsible for agmatine utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **183**, 6517-24.
- Nakano, H., Takehara, E., Nihira, T. & Yamada, Y. (1998). Gene replacement analysis of the *Streptomyces virginiae* barA gene encoding the butyrolactone autoregulator receptor reveals that BarA acts as a repressor in virginiamycin biosynthesis. *J Bacteriol* **180**, 3317-22.
- Namwat, W., Lee, C. K., Kinoshita, H., Yamada, Y. & Nihira, T. (2001). Identification of the varR gene as a transcriptional regulator of virginiamycin S resistance in *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol* **183**, 2025-31.
- Nicholson, S., Bonecini-Almeida Mda, G., Lapa e Silva, J. R., Nathan, C., Xie, Q. W., Mumford, R., Weidner, J. R., Calaycay, J., Geng, J., Boechat, N. & et al.

- (1996). Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* **183**, 2293-302.
- Nigou, J., Zelle-Rieser, C., Gilleron, M., Thurnher, M. & Puzo, G. (2001).** Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol* **166**, 7477-85.
- Noto, T., Miyakawa, S., Oishi, H., Endo, H. & Okazaki, H. (1982).** Thiolactomycin, a new antibiotic. III. In vitro antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 401-10.
- Nozaki, Y., Hasegawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, I. & Shimokata, K. (1997).** Mechanism of nitric oxide-dependent killing of Mycobacterium bovis BCG in human alveolar macrophages. *Infect Immun* **65**, 3644-7.
- Oishi, H., Noto, T., Sasaki, H., Suzuki, K., Hayashi, T., Okazaki, H., Ando, K. & Sawada, M. (1982).** Thiolactomycin, a new antibiotic. I. Taxonomy of the producing organism, fermentation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 391-5.
- Ortalo-Magne, A., Andersen, A. B. & Daffe, M. (1996a).** The outermost capsular arabinomannans and other mannoconjugates of virulent and avirulent tubercle bacilli. *Microbiology* **142**, 927-35.
- Ortalo-Magne, A., Dupont, M. A., Lemassu, A., Andersen, A. B., Gounon, P. & Daffe, M. (1995).** Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* **141**, 1609-20.
- Ortalo-Magne, A., Lemassu, A., Laneelle, M. A., Bardou, F., Silve, G., Gounon, P., Marchal, G. & Daffe, M. (1996b).** Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacterial species. *J Bacteriol* **178**, 456-61.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. & Hinrichs, W. (2000).** Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat Struct Biol* **7**, 215-9.
- Parrish, N. M., Houston, T., Jones, P. B., Townsend, C. & Dick, J. D. (2001).** In vitro activity of a novel antimycobacterial compound, N-octanesulfonylacetamide, and its effects on lipid and mycolic acid synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1143-50.
- Pasula, R., Downing, J. F., Wright, J. R., Kachel, D. L., Davis, T. E., Jr. & Martin, W. J., 2nd (1997).** Surfactant protein A (SP-A) mediates attachment of Mycobacterium tuberculosis to murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **17**, 209-17.
- Pattyn, S. R., Janssens, L., Bourland, J., Saylan, T., Davies, E. M., Grillone, S. & Feracci, C. (1984).** Hepatotoxicity of the combination of rifampin-ethionamide in the treatment of multibacillary leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **52**, 1-6.
- Pelicic, V., Reyrat, J. M. & Gicquel, B. (1996a).** Expression of the Bacillus subtilis sacB gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* **178**, 1197-9.
- Pelicic, V., Reyrat, J. M. & Gicquel, B. (1996b).** Generation of unmarked directed mutations in mycobacteria, using sucrose counter-selectable suicide vectors. *Mol Microbiol* **20**, 919-25.
- Pethe, K., Alonso, S., Biet, F., Delogu, G., Brennan, M. J., Locht, C. & Menozzi, F. D. (2001a).** The heparin-binding haemagglutinin of M. tuberculosis is required for extrapulmonary dissemination. *Nature* **412**, 190-4.
- Pethe, K., F.D., M. & Locht, C. (2001b).** Tuberculose, la porte vers la dissémination extra-pulmonaire. *Médecine/Sciences* **17**, 1220-1221.
- Petit, J.-F. & Lederer, E. (1984).** The structure of the mycobacterial cell wall (peptidoglycan). In *The Mycobacteria: a sourcebook*, pp. 301-311.

- Phetsuksiri, B., Baulard, A. R., Cooper, A. M., Minnikin, D. E., Douglas, J. D., Besra, G. S. & Brennan, P. J. (1999).** Antimycobacterial activities of isoxyl and new derivatives through the inhibition of mycolic acid synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1042-51.
- Pohl, E., Holmes, R. K. & Hol, W. G. (1999).** Crystal structure of the iron-dependent regulator (IdeR) from *Mycobacterium tuberculosis* shows both metal binding sites fully occupied. *J Mol Biol* **285**, 1145-56.
- Pugin, J., Heumann, I. D., Tomasz, A., Kravchenko, V. V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., Glauser, M. P., Tobias, P. S. & Ulevitch, R. J. (1994).** CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity* **1**, 509-16.
- Quadri, L. E., Sello, J., Keating, T. A., Weinreb, P. H. & Walsh, C. T. (1998).** Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding the biosynthetic enzymes for assembly of the virulence-conferring siderophore mycobactin. *Chem Biol* **5**, 631-45.
- Quemard, A., Laneelle, G. & Lacave, C. (1992).** Mycolic acid synthesis: a target for ethionamide in mycobacteria? *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1316-21.
- Rawat, M., Kovacevic, S., Billman-Jacobe, H. & Av-Gay, Y. (2003).** Inactivation of mshB, a key gene in the mycothiol biosynthesis pathway in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* **149**, 1341-1349.
- Raynaud, C., Laneelle, M. A., Senaratne, R. H., Draper, P., Laneelle, G. & Daffe, M. (1999).** Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology* **145**, 1359-67.
- Raynaud, C., Papavinasasundaram, K. G., Speight, R. A., Springer, B., Sander, P., Bottger, E. C., Colston, M. J. & Draper, P. (2002).** The functions of OmpATb, a pore-forming protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **46**, 191-201.
- Rey, D. A., Puhler, A. & Kalinowski, J. (2003).** The putative transcriptional repressor McbR, member of the TetR-family, is involved in the regulation of the metabolic network directing the synthesis of sulfur containing amino acids in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biotechnol* **103**, 51-65.
- Rist, N. (1960).** L'activité antituberculeuse de l'éthionamide. *Adev. Tuberculosis Res.* **10**, 69-126.
- Rodriguez, G. M., Gold, B., Gomez, M., Dussurget, O. & Smith, I. (1999).** Identification and characterization of two divergently transcribed iron regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* **79**, 287-98.
- Rozwarski, D. A., Grant, G. A., Barton, D. H., Jacobs, W. R., Jr. & Sacchettini, J. C. (1998).** Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **279**, 98-102.
- Ruan, J., St John, G., Ehrt, S., Riley, L. & Nathan, C. (1999).** noxR3, a novel gene from *Mycobacterium tuberculosis*, protects *Salmonella typhimurium* from nitrosative and oxidative stress. *Infect Immun* **67**, 3276-83.
- Ruse, M. J. & Waring, R. H. (1991).** The effect of methimazole on thioamide bioactivation and toxicity. *Toxicol Lett* **58**, 37-41.
- Ruse, M. J. & Waring, R. H. (1991).** The S-oxidation of thioamides by rat liver microsomes. *Biochem Soc Trans* **19**, 233S.
- Sambandamurthy, V. K., Wang, X., Chen, B., Russell, R. G., Derrick, S., Collins, F. M., Morris, S. L. & Jacobs, W. R., Jr. (2002).** A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med* **8**, 1171-4.
- Santangelo, M. P., Goldstein, J., Alito, A., Gioffre, A., Caimi, K., Zabal, O., Zumarraga, M., Romano, M. I., Cataldi, A. A. & Bigi, F. (2002).** Negative

- transcriptional regulation of the *mce3* operon in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **148**, 2997-3006.
- Sasaki, H., Oishi, H., Hayashi, T., Matsuura, I., Ando, K. & Sawada, M. (1982).** Thiolactomycin, a new antibiotic. II. Structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* **35**, 396-400.
- Schlesinger, L. S. (1993).** Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol* **150**, 2920-30.
- Schlesinger, L. S., Bellinger-Kawahara, C. G., Payne, N. R. & Horwitz, M. A. (1990).** Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol* **144**, 2771-80.
- Schlesinger, L. S., Hull, S. R. & Kaufman, T. M. (1994).** Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol* **152**, 4070-9.
- Schlesinger, L. S., Kaufman, T. M., Iyer, S., Hull, S. R. & Marchiando, L. K. (1996).** Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. *J Immunol* **157**, 4568-75.
- Schmid, P. C. (1970).** Clinical experiences in cases of primary tuberculosis with tuberculostaticum Isoxyl. *Antibiot Chemother* **16**, 108-16.
- Schmitt, M. P., Predich, M., Doukhan, L., Smith, I. & Holmes, R. K. (1995).** Characterization of an iron-dependent regulatory protein (IdeR) of *Mycobacterium tuberculosis* as a functional homolog of the diphtheria toxin repressor (DtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect Immun* **63**, 4284-9.
- Schorey, J. S., Carroll, M. C. & Brown, E. J. (1997).** A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science* **277**, 1091-3.
- Schroeder, E. K., de Souza, N., Santos, D. S., Blanchard, J. S. & Basso, L. A. (2002).** Drugs that inhibit mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Pharm Biotechnol* **3**, 197-225.
- Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A. & Brennan, R. G. (2001).** Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* **294**, 2158-63.
- Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A. & Brennan, R. G. (2002).** Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. *Embo J* **21**, 1210-8.
- Scorpio, A. & Zhang, Y. (1996).** Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med* **2**, 662-7.
- Senaratne, R. H., Mobasher, H., Papavinasundaram, K. G., Jenner, P., Lea, E. J. & Draper, P. (1998).** Expression of a gene for a porin-like protein of the OmpA family from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *J Bacteriol* **180**, 3541-7.
- Shinnick, T. M. & Good, R. C. (1994).** Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **13**, 884-901.
- Slayden, R. A. & Barry, C. E., 3rd (2000b).** The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect* **2**, 659-69.
- Slayden, R. A., Lee, R. E., Armour, J. W., Cooper, A. M., Orme, I. M., Brennan, P. J. & Besra, G. S. (1996).** Antimycobacterial action of thiolactomycin: an inhibitor of fatty acid and mycolic acid synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2813-9.
- Smith, D. A., Parish, T., Stoker, N. G. & Bancroft, G. J. (2001).** Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infect Immun* **69**, 1142-50.

- Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T. & Jacobs, W. R., Jr. (1990).** Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **4**, 1911-9.
- Springer, B., Master, S., Sander, P., Zahrt, T., McFalone, M., Song, J., Papavinasundaram, K. G., Colston, M. J., Boettger, E. & Deretic, V. (2001).** Silencing of oxidative stress response in *Mycobacterium tuberculosis*: expression patterns of *ahpC* in virulent and avirulent strains and effect of *ahpC* inactivation. *Infect Immun* **69**, 5967-73.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Zhang, Y., Kreiswirth, B. N. & Musser, J. M. (1997).** Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 636-40.
- St John, G., Brot, N., Ruan, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Weissbach, H. & Nathan, C. (2001).** Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9901-6.
- Stenger, S., Hanson, D. A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K. R., Froelich, C. J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melian, A., Bogdan, C., Porcelli, S. A., Bloom, B. R., Krensky, A. M. & Modlin, R. L. (1998).** An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282**, 121-5.
- Stewart, G. R., Ehrt, S., Riley, L. W., Dale, J. W. & McFadden, J. (2000).** Deletion of the putative antioxidant *noxR1* does not alter the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuber Lung Dis* **80**, 237-42.
- Stock, J. B., Ninfa, A. J. & Stock, A. M. (1989).** Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* **53**, 450-90.
- Stover, C. K., Warrenner, P., VanDevanter, D. R., Sherman, D. R., Arain, T. M., Langhorne, M. H., Anderson, S. W., Towell, J. A., Yuan, Y., McMurray, D. N., Kreiswirth, B. N., Barry, C. E. & Baker, W. R. (2000).** A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. *Nature* **405**, 962-6.
- Sullivan, E. A., Kreiswirth, B. N., Palumbo, L., Kapur, V., Musser, J. M., Ebrahimzadeh, A. & Frieden, T. R. (1995).** Emergence of fluoroquinolone-resistant tuberculosis in New York City. *Lancet* **345**, 1148-50.
- Tailleux, L., Schwartz, O., Herrmann, J. L., Pivert, E., Jackson, M., Amara, A., Legres, L., Dreher, D., Nicod, L. P., Gluckman, J. C., Lagrange, P. H., Gicquel, B. & Neyrolles, O. (2003).** DC-SIGN Is the Major *Mycobacterium tuberculosis* Receptor on Human Dendritic Cells. *J Exp Med* **197**, 121-127.
- Takayama, K. & Kilburn, J. O. (1989).** Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **33**, 1493-9.
- Takayama, K. & Qureshi, N. (1984).** Structure and synthesis of lipids. In *The Mycobacteria: a sourcebook*, pp. 315-344. New York.
- Takayama, K., Wang, L. & David, H. L. (1972).** Effect of isoniazid on the in vivo mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2**, 29-35.
- Takiff, H. E., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Huang, W. M., Kreiswirth, B., Cole, S. T., Jacobs, W. R., Jr. & Telenti, A. (1994).** Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* **38**, 773-80.
- Tao, X. & Murphy, J. R. (1994).** Determination of the minimal essential nucleotide sequence for diphtheria toxin repressor binding by in vitro affinity selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9646-50.

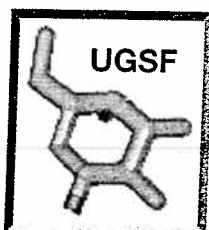


- Tao, X., Schiering, N., Zeng, H. Y., Ringe, D. & Murphy, J. R. (1994). Iron, DtxR, and the regulation of diphtheria toxin expression. *Mol Microbiol* **14**, 191-7.
- Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Lowrie, D., Cole, S., Colston, M. J., Matter, L., Schopfer, K. & Bodmer, T. (1993). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* **341**, 647-50.
- Telenti, A., Philipp, W. J., Sreevatsan, S., Bernasconi, C., Stockbauer, K. E., Wieles, B., Musser, J. M. & Jacobs, W. R., Jr. (1997). The emb operon, a gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* involved in resistance to ethambutol. *Nat Med* **3**, 567-70.
- Titscher, R. (1966). [Monotherapy with isoxyl-DAT in cases of tuberculosis under hospital care]. *Prax Pneumol* **20**, 202-6.
- Urbancik, B. (1970). Clinical experience with thiocarlide (Isoxyl). *Antibiot Chemother* **16**, 117-23.
- Vannelli, T. A., Dykman, A. & Ortiz de Montellano, P. R. (2002). The antituberculosis drug ethionamide is activated by a flavoprotein monooxygenase. *J Biol Chem* **277**, 12824-9.
- Verbist, L. & Gyselen, A. (1968). Antituberculous activity of rifampin in vitro and in vivo and the concentrations attained in human blood. *Am Rev Respir Dis* **98**, 923-32.
- Vilcheze, C., Morbidoni, H. R., Weisbrod, T. R., Iwamoto, H., Kuo, M., Sacchettini, J. C. & Jacobs, W. R., Jr. (2000). Inactivation of the inhA-encoded fatty acid synthase II (FASII) enoyl- acyl carrier protein reductase induces accumulation of the FASII end products and cell lysis of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **182**, 4059-67.
- Walker, G. C. (1996). *The SOS response of Escherichia coli*, 2nd edn. Washington, D. C.: ASM Press.
- Wayne, L. G. & Kubica, G. P. (1986). The mycobacteria: The Berge's manual of systematic bacteriology. , pp. 1436-1457. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Shaper & J. G. Hold. Baltimore: Williams, Wilkins.
- Wayne, L. G. & Sramek, H. A. (1992). Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin Microbiol Rev* **5**, 1-25.
- Weber, I., Fritz, C., Ruttkowski, S., Kreft, A. & Bange, F. C. (2000). Anaerobic nitrate reductase (narGHJI) activity of *Mycobacterium bovis* BCG in vitro and its contribution to virulence in immunodeficient mice. *Mol Microbiol* **35**, 1017-25.
- WHO (2000). Global tuberculosis control. . Geneva Switzerland: World Health Organization.
- WHO (2001). Global tuberculosis control. . Geneva Switzerland: World Health Organization.
- Winder, F. G. (1982). Mode of action of the antimycobacterial agents and associated aspects of the molecular biology of the mycobacteria. In *The biology of the mycobacteria*, pp. 353-438. Edited by C. R. a. J. Stanford. London: Academic Press.
- Winder, F. G. & Collins, P. B. (1970). Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Gen Microbiol* **63**, 41-8.
- Winder, F. G., Collins, P. B. & Whelan, D. (1971). Effects of ethionamide and isoxyl on mycolic acid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* BCG. *J Gen Microbiol* **66**, 379-80.
- Wink, D. A., Kasprzak, K. S., Maragos, C. M., Elespuru, R. K., Misra, M., Dunams, T. M., Cebula, T. A., Koch, W. H., Andrews, A. W., Allen, J. S. & et al. (1991). DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* **254**, 1001-3.

- Winterling, K. W., Chafin, D., Hayes, J. J., Sun, J., Levine, A. S., Yasbin, R. E. & Woodgate, R. (1998).** The Bacillus subtilis DinR binding site: redefinition of the consensus sequence. *J Bacteriol* **180**, 2201-11.
- Wu, C. H., Tsai-Wu, J. J., Huang, Y. T., Lin, C. Y., Lioua, G. G. & Lee, F. J. (1998).** Identification and subcellular localization of a novel Cu,Zn superoxide dismutase of Mycobacterium tuberculosis. *FEBS Lett* **439**, 192-6.
- Xia, Y. & Zweier, J. L. (1997a).** Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6954-8.
- Zhang, Y. (1993).** Genetic basis of isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. *Res Microbiol* **144**, 143-9.
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D. & Cole, S. (1992).** The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. *Nature* **358**, 591-3.
- Zhang, Y., Lathigra, R., Garbe, T., Catty, D. & Young, D. (1991).** Genetic analysis of superoxide dismutase, the 23 kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* **5**, 381-91.
- Zimhony, O., Cox, J. S., Welch, J. T., Vilcheze, C. & Jacobs, W. R., Jr. (2000).** Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FASI) of Mycobacterium tuberculosis. *Nat Med* **6**, 1043-7.
- Zimmerli, S., Edwards, S. & Ernst, J. D. (1996).** Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, 760-70.

## Résumé

L'éthionamide (ETH) est un puissant antituberculeux de seconde ligne utilisé pour le traitement des patients infectés par des souches de *Mycobacterium tuberculosis* multirésistantes aux antibiotiques de première intention. Bien que l'ETH soit un analogue structural de l'isoniazide (INH) et que ces deux antibiotiques partagent une cible moléculaire commune (InhA), il n'est cependant observé que peu de résistances croisées parmi les isolats cliniques. Au cours de cette étude, nous avons identifié deux gènes de *M. tuberculosis*, *Rv3854c* (*ethA*) et *Rv3855* (*ethR*), impliqués dans la résistance à l'ETH. L'analyse de la séquence en acides aminés de EthA, montrant que cette protéine appartient à la famille des monooxygénases, et la surproduction de EthA, conduisant à un phénotype d'hypersensibilité des mycobactéries à l'ETH, suggèrent que EthA peut être l'activateur biologique de la pro-drogue ETH. Parallèlement, la surexpression de *ethR*, gène voisin de *ethA*, génère des mycobactéries hautement résistantes à l'ETH. L'analyse de la séquence en acides aminés révèle l'existence dans la région amino-terminale de EthR d'un motif hélice-tour-hélice caractéristique des régulateurs de la famille TetR/CamR. En outre, l'inactivation de *ethR* chez *M. tuberculosis* rend le bacille hypersensible à l'ETH. Ensemble, ces informations suggèrent que EthR pourrait réguler l'expression de *ethA*. Grâce à des expériences de génétique, de biochimie et de biologie moléculaire, nous avons confirmé que EthR régule négativement l'expression de *ethA* et que cette régulation se fait par fixation directe et spécifique du régulateur sur la région promotrice du gène *ethA*. Nous avons montré que le site d'initiation de la transcription de *ethA* est localisé dans la zone opératrice de EthR de 55 pb définie par l'analyse d'empreinte à la DNase I. Pour la première fois, nous montrons qu'un régulateur de la famille TetR/CamR se fixe sur son opérateur par octamérisation de type coopératif. Ce comportement original a motivé l'étude cristallographique de EthR qui révèle une structure dimérique ligandée à deux molécules hydrophobes de faible poids moléculaire. Ces travaux ouvrent des perspectives de développement d'inhibiteurs potentiels de EthR qui pourraient aboutir à l'amélioration du traitement de la tuberculose.



Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle  
UMR CNRS/USTL n° 8576 - IFR 118  
Unité affiliée à l'INSERM

RAPPORT DE SOUTENANCE DE LA THESE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

De Jean ENGOHANG NDONG

---

DATE DE LA SOUTENANCE 23 octobre 2003

INTITULE DE LA THESE

*Mécanismes génétiques de l'activation de la pro-drogue  
éthionamide chez les mycobactéries*

COMPOSITION DU JURY

Président Delannoy P., Professeur, Univ. de Lille 1  
Rapporteurs Simonet M., Professeur, Univ. Lille 2  
Reyrat J.M., CR INSERM, Univ. Paris 5  
Examineurs M'Batchi B., Professeur, UST de Masuku Franceville Gabon  
Baulard A. CR INSERM, Institut Pasteur de Lille  
Directeur Locht C., DR INSERM, Institut Pasteur de Lille

## APPRECIATIONS DU JURY

Monsieur Jean Engohang Ndong a soutenu le 23 octobre 2003 sa thèse de doctorat devant le jury de l'Université des Sciences et Technologies de Lille. La présentation de Monsieur Engohang Ndong fut de très bonne qualité, bien structurée et très didactique. Le jury a apprécié la qualité de l'exposé et la sobriété de l'iconographie, permettant de suivre aisément la démarche expérimentale et la progression dans l'exposé des résultats.

Dans la partie introductive de son exposé, Monsieur Engohang Ndong a fait le point des connaissances sur les mycobactéries et l'infection par *Mycobacterium tuberculosis* en soulignant la nécessité de développer de nouvelles stratégies antituberculeuses pour lutter plus efficacement contre les pathogènes résistants aux antibiothérapies existantes. Il a ensuite souligné l'importance d'une meilleure connaissance du mode d'action des antibiotiques ainsi que des mécanismes moléculaires impliqués dans l'acquisition de la résistance. Le candidat a ensuite détaillé très clairement les objectifs de son travail de thèse. La clarté de son exposé oral a été soulignée par le jury.

Dans la continuité du mémoire, la suite de l'exposé a mis en lumière l'importance des résultats expérimentaux obtenus au cours de cette étude portant sur le gène *ethR* responsable du phénotype de résistance à l'éthiodamide. Le candidat a ainsi montré que le produit du gène *ethR* agit comme un régulateur négatif du gène *ethA* impliqué dans la bioactivation de l'antibiotique. Il a ensuite déterminé le mécanisme moléculaire d'action de ce régulateur transcriptionnel et ses modalités d'interaction avec l'ADN au niveau d'une région spécifique. Enfin, le candidat a résolu la structure tridimensionnelle de ce complexe de régulation par cristallisation et diffraction des rayons X. Les membres du jury ont unanimement souligné la masse de travail consignée dans ce mémoire et leurs questions ont révélé la grande maturité scientifique du candidat. Le jury a également souligné la grande capacité d'adaptation du candidat qui a su maîtriser les nombreuses techniques nécessaires au bon déroulement de cette thèse. Le candidat a également fait la preuve de son aptitude à envisager la suite de son travail et à proposer de nouvelles approches, et l'ensemble du jury a réellement apprécié la discussion.

Compte tenu de l'importance des résultats présentés qui ont déjà donné lieu à deux publications dans des revues de premier plan et qui ont conduit à la rédaction d'une demande de brevet, c'est à l'unanimité que le jury a décidé de décerner à Monsieur Jean Engohang Ndong le grade de Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille avec la mention **Très Honorable** et les **félicitations du jury inscrites au procès verbal**.

Villeneuve d'Ascq, le 23 octobre 2003

BAULARD A. 

DELANNOY P. 

LOCHT C. 

M'BATCHI B. 

REYRAT J.M. 

SIMONET M. 