

# **THESE**

*présentée devant*

L'UNIVERSITE PAUL SABATIER DE TOULOUSE III

*en vue de l'obtention du*

## **DOCTORAT D'UNIVERSITE**

Ecole doctorale de Biologie-Santé-Biotechnologie

*Spécialité : Biochimie*

*par*

Damien Portevin

**ETUDE DU ROLE DES POLYKETIDES MYCOBACTERIENS  
DANS LA BIOGENESE DE L'ENVELOPPE  
ET LA VIRULENCE DES MYCOBACTERIES :**  
Caractérisation de l'étape de condensation des acides mycoliques

Soutenue le 8 juillet, devant la commission d'examen

**Dr Locht Camille**  
**Pr Bayan Nicolas**  
**Pr Clottes Eric**  
**Pr Cole Stewart**  
**Dr Poupot Rémy**  
**Dr Guilhot Christophe**

Rapporteur  
Rapporteur  
Président du jury  
Examinateur  
Examinateur  
Directeur de thèse



**AUTEUR** : PORTEVIN Damien

**TITRE** : *Etude du rôle des polykétides dans la biogenèse de l'enveloppe et la virulence des mycobactéries* : Caractérisation de l'étape de condensation des acides mycoliques.

**DIRECTEUR** : GUILHOT Christophe

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE** : Toulouse, le 08 Juillet 2005

---

## **RESUME**

*Mycobacterium tuberculosis* est l'agent étiologique de la tuberculose. La recrudescence de la tuberculose, favorisée par l'épidémie de VIH et associée à l'apparition de souches résistantes aux antibiotiques, souligne la nécessité de déterminer les mécanismes moléculaires de sa pathogénicité et de développer de nouveaux antibiotiques. Le génome de *M.tuberculosis* recèle un grand nombre de gènes codant des polykétides synthases (Pks). Nous avons procédé à l'inactivation systématique par recombinaison homologue des gènes *pks* de *M.tuberculosis* pour évaluer l'importance des métabolites dérivés de polykétides dans la virulence du bacille en modèle murin. Nous soulignons ainsi l'importance des métabolites dérivés de Pks12 dans la persistance de *M.tuberculosis*. Par ailleurs, nous dévoilons le caractère essentiel de Pks13 pour la croissance des mycobactéries en démontrant son implication dans l'étape de condensation des acides mycoliques. Enfin, nous avons pu élucider la nature et le rôle des partenaires protéiques de Pks13 nécessaires à cette étape de condensation.

---

## **MOTS-CLES**

Polykétides synthases, mycobactéries, virulence, condensase, acides mycoliques

---

## **DISCIPLINE ADMINISTRATIVE**

Biochimie

---

## **INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE**

Pathogénie moléculaire des mycobactéries  
Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale IPBS-CNRS  
205 route de Narbonne 31077 Toulouse Cedex



## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie structurale du CNRS dirigé par Monsieur le professeur François Amalric. Je remercie Monsieur Amalric pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ainsi que pour sa disponibilité d'encadrement lors des ateliers de DEA.

Je remercie Messieurs Camille Lochet et Nicolas Bayan pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et d'évaluer ce manuscrit. Je remercie également Messieurs Stewart Cole et Remy Poupot pour leur examen du manuscrit et de la soutenance ainsi que Monsieur Eric Clottes pour l'avoir présider.

Ce travail a été dirigé par Monsieur Christophe Guilhot, directeur de recherche au CNRS, que je remercie très sincèrement pour la pertinence du sujet initialement proposé mais aussi pour sa disponibilité de tout les instants et cette confiance qu'il a su m'inspirer lors des inévitables moments de doute que j'ai pu traverser et qui me donne encore aujourd'hui l'envie de continuer à chercher . . .

Ce travail a été effectué en étroite collaboration avec l'équipe du Docteur Mamadou Daffé. Je le remercie sincèrement pour m'avoir permis d'intégrer son laboratoire au besoin et pour m'avoir permis d'interagir aussi bien avec lui-même qu'avec chacun des nombreux membres de son équipe (dont la richesse tant humaine que scientifique a sans aucun doute très fortement catalysé l'épanouissement de ce travail).

Je voudrais également remercier les équipes externes à l'IPBS qui ont contribué à ce travail et tout particulièrement l'équipe du Docteur Christine Koussin à Orsay avec Celia De Sousa D'Avria, qui entre deux déménagements nous ont construits les mutants de *C.glutamicum*, nous apportant par là-même une des clefs pour l'identification de la condensase. Je remercie

également le Docteur Chami Mohamed du Biozentrum à Bahl pour sa contribution et son analyse en cryofracture.

Je tiens à remercier les étudiants de ma promotion de DEA et en particulier, les membres de la « dream-team », Thomas Clouaire, Aude Ragas et Vladimir Malaga, pour leur soutien fraternel et toutes ces bonnes rigolades qui ont égayés cette année difficile, et merci d'être resté les mêmes tout au long de ces quatre années. Merci également à mes encadrants de DEA, Bernard Montsarrat, Odile Schiltz, Pascale Peyron, Joon Stegmann. Je tiens également à remercier amicalement Stéphane Claverol pour m'avoir expliqué patiemment la résonance magnétique nucléaire, initié à la spectrométrie de masse et aux vins du Gers.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe pédagogique de la section de biochimie de l'université Paul Sabatier pour m'avoir accueilli en tant que moniteur et ATER en leur sein. Merci de m'avoir initié et par là même transmis le plaisir d'enseigner.

Je voudrais également remercier ma famille et en particulier ma mère pour m'avoir toujours donné les moyens et les encouragements nécessaires pour poursuivre le long parcours qui mène à la thèse.

Enfin un immense merci à toi, élène, pour ton oreille attentive, tes précieux conseils et pour m'avoir donné durant cette thèse alors que la tienne n'en était qu'à ses balbutiements, ce souffle de vie, notre fils Eliot, à qui je dédie ce manuscrit . . .

## ABSTRACT

Since the antiquity, mycobacteria have been involved in lethal pathology such as leprosy or tuberculosis, the latter caused by *Mycobacterium tuberculosis* and the former by *Mycobacterium leprae*. Despite modern medicine including antibiotics, tuberculosis keep on being the first cause of mortality due to a single infectious agent with an average of two millions deaths per year, according to the world health organisation (WHO, 2002). Tuberculosis is a real plague in the majority of developing countries where its endemy correlates those of the HIV epidemy. Furthermore the number of tuberculosis patient number in Europe as well as in other developing countries is still not negligible. Moreover, the emergence of strains resistant to the currently used antibiotics is worrying the medical profession by reducing available active molecules. Without the huge mortality associated with tuberculosis, this disease would be considered as a parasitic infection regarding the estimated number of infected but asymptomatic people (around 33% of the world population). Recently, the WHO has initiated a global approach to control the epidemy. In a parallel direction, efforts in fundamental and clinical investigation are under way to understand tuberculosis pathogeny and to develop new clinical tools. Recently, the entire genome of *M.tuberculosis* was sequenced. It revealed 250 genes related to lipid biosynthesis, which represents a considerable involvement regarding the approximately 50 genes found in *E.coli* genome. Remarkably 24 of this 250 genes encode polyketide synthase (Pks). In other bacteria, these enzymes are known to produce complex molecules with pharmaceutical interest. In mycobacteria, the mycolactone, is a potent toxin produced by *Mycobacterium ulcerans*. Recently, numerous polyketides has been shown to be components of the *M.tuberculosis* envelop. This envelop represents a powerful weapon for the tuberculous bacillus constituting a permeability barrier and delivering immunological advantages. The genetic approach used in this work allowed us to evaluate the contribution of the various polyketides in the virulence of *M.bovis* BCG and *M.tuberculosis* in a mouse model. Furthermore, we characterised the function of the locus including the polyketide synthase 13, an acyl-AMP synthase and an acyl-coA carboxylase in the last step of mycolic acid biosynthesis. Mycolic acids are major constituent of the mycobacterial cell envelop and are essential for mycobacterial viability, therefore the enzymes characterised in the second part of this work constitutes promising targets for developing new antituberculous drugs.



## RESUME

Certaines mycobactéries sont responsables à l'heure actuelle et depuis l'antiquité de pathologies infectieuses graves comme la tuberculose, résultante d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis*. En dépit d'une médecine efficace liée à l'avènement des antibiotiques, cette infection bactérienne est à l'échelle mondiale, la première cause de mortalité due à un agent infectieux. Deux millions de décès seraient annuellement liés à cette pathologie selon les données de l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2002). La tuberculose est un véritable fléau dans la majorité des pays en voie de développement où son endémie corrèle celle liée à l'épidémie du VIH, et le nombre de tuberculeux recensé en Europe comme dans d'autres pays développés reste non négligeable. La pathogénie du bacille tuberculeux laisse apparaître un équilibre quasi-parasitique avec un tiers de la population mondiale infectée. L'apparition de souches multi-résistantes aux chimiothérapies actuelles inquiète le milieu médical en réduisant le nombre de médicaments disponibles. Une stratégie de prise en charge mondiale par l'OMS a récemment été adoptée pour tenter d'endiguer l'épidémie de tuberculose. En parallèle, des efforts en recherche fondamentale et clinique sont entrepris afin de décortiquer la pathogénie du bacille tuberculeux pour mieux le combattre. Dans cet objectif, le séquençage récent de son génome a représenté une avancée majeure. Il dévoile notamment 250 gènes relatifs à la biosynthèse lipidique, soit cinq fois plus que chez *E.coli*, dont 24 coderaient des polykétides synthases (Pks). Ces enzymes sont sources de molécules complexes souvent biologiquement actives, dont la toxine de *Mycobacterium ulcerans*, la mycolactone, est particulièrement représentative chez les mycobactéries. Récemment, nombre de produits de polykétides synthases se sont révélés être des composantes de l'enveloppe de *Mycobacterium tuberculosis*. Cette enveloppe représente une arme remarquable pour le bacille tuberculeux tant par la barrière d'imperméabilité qu'elle constitue que par ses propriétés immunologiques vraisemblablement impliquées dans sa résistance à l'immunité de l'hôte. L'approche génétique abordée dans ce travail a permis d'évaluer la contribution des différents polykétides mycobactériens dans la virulence de *M.bovis* BCG et *M.tuberculosis* en modèle murin. De plus, nous avons pu caractériser la fonction d'un locus comprenant la polykétide synthase 13 ainsi qu'une acyl-AMP synthase et une acyl-coA carboxylase dans la dernière étape de la biosynthèse des acides mycoliques, lipides majeurs de l'enveloppe mycobactérienne et essentiels pour la survie des mycobactéries. Ainsi, les enzymes caractérisées dans ce travail constituent des cibles de choix pour le développement de nouveaux antituberculeux.



# SOMMAIRE

## I) INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

### I.1) Phylogénie et pathogénie des mycobactéries

|  |    |
|--|----|
| I.1.1) La phylogénie des mycobactéries .....                     | 13 |
| I.1.2) Les corynebacterineae dans les pathologies humaines ..... | 13 |

### I.2) La tuberculose

|   |    |
|---|----|
| I.2.1) Données épidémiologiques .....   | 18 |
| I.2.2) Infection et dépistage de la tuberculose .....                           | 20 |
| I.2.3) La prévention et les traitements actuels .....                           | 22 |
| I.2.4) Le macrophage à la base du processus pathologique .....                  | 28 |
| I.2.5) La transmission de la tuberculose : du parasitisme à la pathogénie ..... | 29 |

### I.3) L'enveloppe et ses composés dans la pathogénie tuberculeuse

|  |    |
|--|----|
| I.3.1) L'enveloppe mycobactérienne .....   | 35 |
| I.3.2) Structure et fonction des lipides impliquées dans la virulence de <i>M.tuberculosis</i> |    |
| I.3.2.1) Les Acides mycoliques et leurs décorations .....                                      | 37 |
| I.3.2.2) Les Dimycosérosates de phthiocérol ( <i>DIMs</i> ) .....                              | 43 |
| I.3.2.3) Les PhénoGlycolipides ( <i>PGLs</i> ) .....   | 45 |
| I.3.2.4) Les lipides à tréhalose .....   | 47 |
| I.3.2.5) Les glycolipides mannosylés ( <i>PIMs/LM/LAM</i> ) .....                              | 51 |

### I.4) Les polykétides synthases

|   |    |
|---|----|
| I.4.1) Généralités et données bibliographiques .....                  | 55 |
| I.4.2) Les polykétides synthases de <i>M.tuberculosis</i> H37Rv ..... | 61 |
| I.4.3) Situation du projet de recherche .....                         | 70 |

## II) RESULTATS

### II.1) Approche systématique dans l'étude des loci Pks spécifiques de *M.tuberculosis*

|  |    |
|--|----|
| II.1.1) Introduction aux outils génétiques d'inactivation génique .....        | 71 |
| II.1.2) Stratégie choisie pour cette étude .....                               | 77 |
| II.1.3) Bilan des expérimentations pour l'obtention des souches mutantes ..... | 79 |
| II.1.4) Analyse biochimique globale des mutants de Pks .....                   | 80 |
| II.1.5) Analyse de la virulence résiduelle des mutants de Pks .....            | 86 |
| II.1.6) Discussion .....   | 90 |

### II.2) Approche ciblée dans l'étude d'un locus Pks conservé chez les *Corynebacterineae*

|   |     |
|---|-----|
| II.2.1) Caractérisation de Pks13 comme la condensase des acides mycoliques ( 1 <sup>er</sup> article) ... | 99  |
| II.2.2) L'activation des substrats pour la condensation des acides mycoliques (2 <sup>ème</sup> article)  | 101 |

## III) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....

103

## IV) MATERIELS ET METHODES .....

109

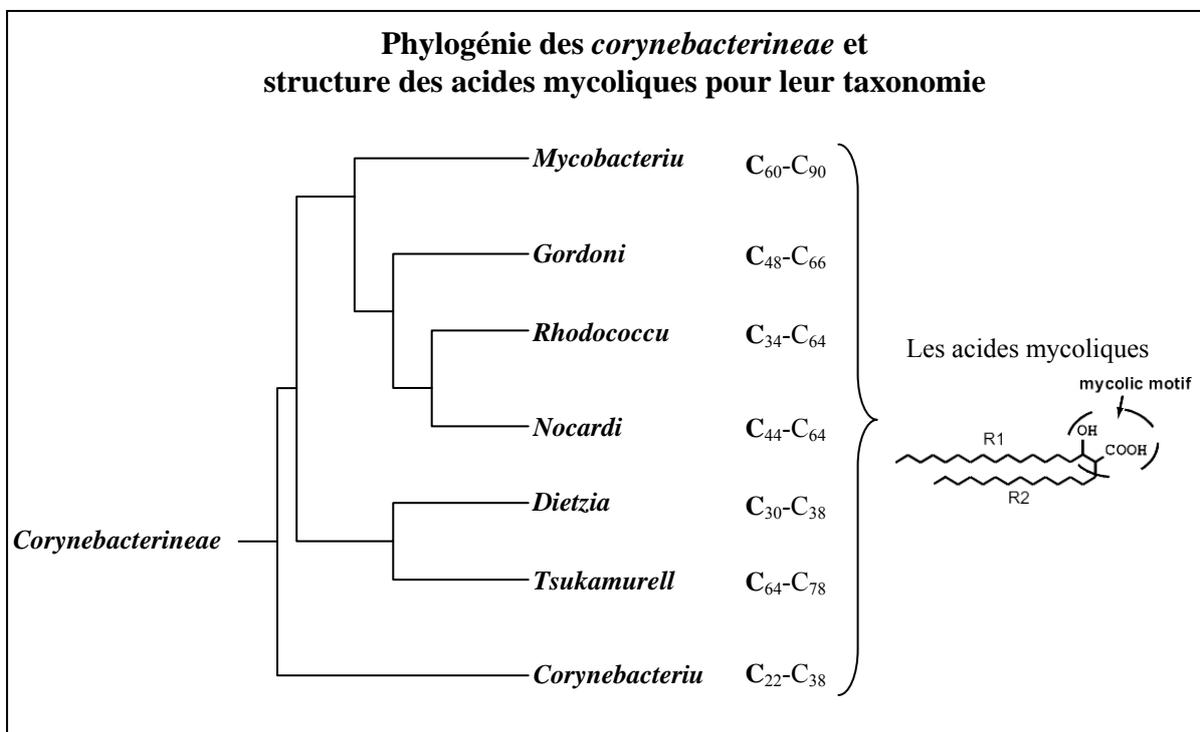
## V) ANNEXES (I : Lexique ; II : Brevet d'invention ) .....

121

## VI) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....

123

Figure 1



## I) INTRODUCTION

### I.1) Phylogénie et pathogénie des mycobactéries

#### I.1.1) La phylogénie des mycobactéries

Le genre *Mycobacterium* appartient au grand taxon des actinomycètes et plus précisément au sous-ordre des *Corynebacterineae* anciennement retrouvé dans la littérature sous le nom de cluster CMN pour *Corynebacteriaceae*, *Mycobacteriaceae* et *Nocardiaceae*. On y retrouve également les genres *Rhodococcus*, *Gordona* et *Tsukamurella*. Ce sont des bactéries aérobies à Gram positif qui partagent toutes, la propriété unique à ce groupe phylogénétique de produire des acides gras particuliers : les acides mycoliques (Pour revue, Embley and Stackebrandt, 1994). Ces derniers sont des acides gras alpha ramifiés et beta hydroxylés dont la longueur des ramifications va varier selon le genre et l'espèce de *Corynebacterineae* (Figure 1).

Au sein de ce sous-ordre, le genre *Mycobacterium* a été très largement étudié pour des raisons médicales. Il regroupe une soixantaine d'espèces dont la plupart sont des organismes saprophytes nichant dans le sol. Par définition, ces microbes se nourrissent de matières mortes et ne nuisent pas à l'organisme humain. Quelques espèces pourtant sont des pathogènes majeurs à l'origine de la tuberculose (*M.tuberculosis*, *M.africanum*, *M.bovis*) et de la lèpre (*M.leprae*). D'autres sont également responsables d'infections opportunistes spécialement chez les individus immuno-déprimés (*M.avium*, *M.xenopi*, *M.kansasii*, *M.chelonae*, *M.fortuitum*).

#### I.1.2) Les corynebacterineae dans les pathologies humaines

- *Corynebacterium diphtheriae*

Le bacille isolé par Klebs en 1883 est responsable de la diphtérie. Il induit la formation d'une pseudo-membrane sur les amygdales et produit une puissante toxine neurotrophe codée par un gène judicieusement nommé *tox*, d'origine phagique (Holmes, 2000). La toxine entraîne des paralysies de la déglutition, des paralysies oculaires, du diaphragme puis des membres. Une atteinte maligne hémorragique et œdémateuse peut rapidement s'avérer fatale. La vaccination par une forme atténuée de la toxine après traitement par la formaline a permis

d'éradiquer aujourd'hui la maladie dans la plupart des pays développés. En 1995 une recrudescence de diphtérie a été notée en Russie ainsi qu'en Roumanie (Holmes, 2000).

- *Mycobacterium ulcerans*

Cette mycobactérie est à l'origine d'une pathologie cutanée indolore mais destructrice qui se manifeste par des nodules cutanés pouvant aller jusqu'à des lésions ulcérées nécrotiques (ulcère de Buruli). Elle sévit principalement dans les pays d'Afrique de l'ouest où la prévalence de la maladie dépasse celle de la lèpre et avoisine celle de la tuberculose. La transmission se ferait par pénétration cutanée, le bacille nichant principalement dans les eaux stagnantes. Il a aussi pu être détecté au niveau des glandes salivaires de certains insectes aquatiques qui vivent dans ces zones d'endémie et qui pourraient constituer de bons vecteurs de transmission par piqûre (Marsollier *et al.*, 2002). Cette pathologie serait essentiellement due à la production d'une toxine par *M.ulcerans* : la mycolactone (George *et al.*, 1999). Le génome de *M.ulcerans* a été montré génétiquement proche de *M.marinum* avec 98 % d'identité, les deux souches ayant récemment divergé (Stinear *et al.*, 2000). D'ailleurs *M.marinum*, nichant aussi dans des environnements aquatiques, est également à l'origine de pathologies cutanées. L'étude comparative de leurs génomes a permis d'identifier la présence d'un plasmide de 170 kb spécifique des souches virulentes de *M.ulcerans*. Ce plasmide coderait notamment un complexe protéique de trois gigantesques enzymes multifonctionnelles (1,8, 0,26 et 1,2 MDa) à l'origine de la biosynthèse du macrolide toxique, et qui possède les propriétés cytotoxiques, analgésiques et immunosuppressives caractéristiques de cette pathologie (Stinear *et al.*, 2004). Le traitement, essentiellement basé sur la chirurgie, est source de scarification et d'amputations et les thérapies anti-mycobactériennes envisagées aujourd'hui ne permettront pas d'endiguer les effets dévastateurs de la mycolactone qui perdurent après disparition de la bactérie et au-delà du site infectieux. La conception d'antagonistes de cette mycolactone permettrait d'améliorer significativement le traitement des ulcères de Buruli.

Des résultats prometteurs concernant une protection croisée de *M.bovis* BCG via notamment l'antigène 85A, dont les auteurs ont caractérisé l'homologue de *M.ulcerans* à 84% identique à celle de BCG, ont récemment été mis en exergue par la construction d'un vaccin ADN dans un modèle murin (Tanghe *et al.*, 2001).

- *Mycobacterium avium* et autres mycobactéries atypiques

Les mycobactéries autres que *M.tuberculosis* et *M.leprae* sont communément regroupées dans la littérature sous le nom de mycobactéries non-tuberculeuses (NTM). Ce sont des pathogènes opportunistes de l'homme dont les affections sont généralement associées à d'autres pathologies provoquant une immuno-déficience (VIH, susceptibilité mendélienne ou traitement par des corticoïdes) (Pour revue, Wagner and Young, 2004). De nombreuses NTM sont à l'origine d'infections pulmonaires, la plupart du temps dues aux souches du complexe de *M.avium* (MAC) et de manière plus anecdotique à *M.kansasii*, *M.xenopi*, *M.abscessus* ou *M.malmoense* selon les zones d'endémies. Sur le plan clinique, ce type de pathologie est difficilement distinguable d'une infection par *M.tuberculosis*. Dans les deux cas, une analyse microscopique laisse apparaître la présence de bacilles acido-alcoolo résistants (§1.2.2) dans les prélèvements de fluide broncho-alvéolaire et des nodules voir des infiltrations granulomateuses à la radiographie des poumons. Ce n'est qu'avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire, notamment de PCR, commercialisée par certaines entreprises pharmaceutiques, que la différenciation rapide des NTM du bacille tuberculeux a été possible (Piersimoni and Scarparo, 2003). Par ailleurs, on remarque à nouveau *M.avium*, *M.malmoense* et *M.scrofulaceum* dans des adénites infectieuses. Des atteintes cutanées dues à des infections par *M.marinum* se caractérisent par la formation de papules violacées progressant vers des ulcérations superficielles qui finiront par laisser des cicatrices. Enfin, des infections nosocomiales, en particulier suite à une intervention chirurgicale, peuvent être causées par ces NTM et se manifestent notamment par des atteintes osseuses, articulaires ou cutanées. La plupart des infections par des NTM sont traitées par des cocktails d'antibiotiques sur des périodes nécessitant jusqu'à 18 mois de traitement. Seules les infections pulmonaires liées à *M.abscessus* et les adénites en général nécessitent l'ablation chirurgicale de l'organe infecté.

- *Mycobacterium leprae*

Bacille découvert par Armauer HANSEN en 1874, *M.leprae* est l'agent étiologique de la lèpre, maladie connue depuis l'Antiquité, les premières descriptions dateraient de -600 av JC. Cette bactérie présente le temps de génération le plus long connu à ce jour : environ 14 jours. Incultivable en laboratoire, le bacille est un parasite intracellulaire obligatoire. Cette particularité a pu être interprétée depuis le séquençage de son génome qui laisse apparaître une dégénérescence marquée en particulier au niveau des gènes impliqués dans le

métabolisme (Cole *et al.*, 2001). Il colonise préférentiellement les régions froides du corps et possède un tropisme pour les macrophages et les cellules de Schawnn. Bien que peu contagieuse, la lèpre se transmettrait après contact rapproché d'un individu malade via des gouttelettes générées par les voies aériennes supérieures (Boggild *et al.*, 2004). On distingue deux formes principales de lèpre :

- La lèpre tuberculoïde ou paucibacillaire. Ses manifestations sont essentiellement cutanées (taches hypochromiques) et nerveuses (hypertrophie des nerfs périphériques). Des troubles de la sensibilité suivi de troubles moteurs résultent de la destruction des axones myélinisés par les infiltrats granulomateux.

- La lèpre lépromateuse ou multibacillaire. Elle se rencontre chez les sujets ayant une faible résistance vis-à-vis de *M. leprae* et se caractérise par de nombreuses lésions cutanées et viscérales qui pullulent de bacilles. Ses manifestations extra-cutanées sont traumatisantes, entre autres rhinites, laryngites et conjonctivites aboutissent, en absence de traitement, respectivement à l'effondrement de la cloison nasale, une dysphonie et la cécité.

La lèpre est une maladie guérissable et un traitement précoce permet d'éviter les incapacités. La polychimiothérapie ou PCT (Dapsone, rifampicine et clofazimine) préconisée par l'OMS et gratuitement mise à disposition par la fondation Novartis a permis de réduire de façon spectaculaire la morbidité et d'abaisser la prévalence de la maladie de 90% (Données de l'OMS). La lèpre a ainsi été éliminée dans 108 pays et n'est plus considérée comme un problème majeur de santé publique, 20 ans après l'état d'alerte décrété en 1985 dans 122 pays. L'Inde qui abrite 70% des personnes atteintes de la lèpre enregistrées dans le monde reste un lieu sensible. De manière remarquable, aucune résistance à la PCT n'a été reportée à ce jour. La période d'incubation entre l'infection et les premiers signes de la pathologie est estimé en moyenne à 4 ans pour les formes paucibacillaire et 10 ans pour les lépromateuses. Ceci permet d'expliquer pourquoi malgré une baisse considérable de la prévalence des cas de lépreux traités, l'incidence de nouveaux cas reste relativement stable. Ainsi sans approche prophylactique de dépistage des individus infectés et de traitements systématiques des individus proches des nouveaux cas, l'éradication de la lèpre n'est pas encore à l'ordre du jour (Pour revue, Britton & Lockwood, 2004).

- *Mycobacterium tuberculosis*

*M.tuberculosis* est l'agent étiologique de la tuberculose. Il appartient à un complexe comprenant *M.africanum* et *M.canetti* pour les pathogènes humains, *M.microti* qui lui possède un tropisme pour les rongeurs et *M.bovis* à spectre plus large mais infectant notamment les bovidés. Ce dernier a été à l'origine de contaminations humaines par le lait de vache avant que celui-ci ne soit stérilisé de manière systématique. Des travaux récents suggèrent que l'ancêtre commun des bactéries du complexe *M.tuberculosis* aurait infecté l'homme en premier lieu, puis aurait modifié son tropisme au cours de l'évolution (Brosch *et al.*, 2002). La forme la plus courante de la tuberculose est l'infection des poumons et des ganglions lymphatiques drainants. D'autres endroits du corps peuvent être infectés comme les os, les reins et même la circulation sanguine, bien que beaucoup plus rarement. Seule la tuberculose pulmonaire est contagieuse.

L'histoire des affections humaines à *M.tuberculosis* semble s'initier avant les premières descriptions médicales de l'antiquité. En effet, les scientifiques ont pu déceler la présence de l'ADN et des acides mycoliques de *M.tuberculosis* dans des momies égyptiennes présentant des atteintes osseuses caractéristiques (Gernaey *et al.*, 2001). Vers 460 avant J-C, le médecin grec Hippocrate identifie la phtisie comme la maladie la plus répandue de l'époque et remarque qu'elle est presque toujours fatale. Les premières descriptions post-mortem des différentes affections pulmonaires générées par la maladie que sont tubercules, miliaire et fibrose chronique remontent au milieu du XVIIème siècle. En 1819, René Théophile Laënnec, médecin et scientifique, fervent adepte du stéthoscope et fondateur de la méthode anatomo-clinique, identifie clairement les signes cliniques propres à la tuberculose comme la pectoriloquie : « la voix semble venir de la poitrine, tant elle est renforcée et signe l'existence de larges cavernes pulmonaires » (Laënnec, 1819). Ironie du sort, la tuberculose l'emporta à son tour en 1826, à l'âge de 45 ans. En 1854 apparaît le premier sanatorium à Gomersdorf dont l'objectif sera non seulement d'isoler les malades mais aussi d'augmenter notablement leur chance de guérison par un repos forcé et une alimentation équilibrée. En 1868, Jean-Antoine Villemin rédige un ouvrage détaillé de ses études sur la tuberculose : « La tuberculose est inoculable ». Il devait à l'époque affronter les partisans de la génération spontanée et démontrer qu'au même cas que la typhoïde et la syphilis, l'organisme humain peut devenir le réceptacle propice au développement de germes qu'il a reçu et non créé. C'est ainsi qu'il fut le premier à démontrer la transmissibilité inter-espèces de la tuberculose sans en connaître l'origine exacte à partir de divers produits tuberculeux comme ceux de la phtisie

vulgaire, de la matière infiltrée de la pneumonie caséuse ou des pus ganglionnaires dits « scrofuleux » (Villemin, 1868). Très controversée sur le moment, cette affirmation recevra une confirmation éclatante en 1882 quand Robert Koch réussit à identifier le bacille qui portera son nom comme l'agent infectieux responsable de la tuberculose. L'apparition de la radiographie à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle laisse place à un diagnostic affiné de l'évolution de la maladie du patient tuberculeux. Le bacille de Calmette et Guérin (BCG), forme atténuée d'une souche de *M.bovis* découvert 21 ans plus tôt, est utilisé pour la première fois comme souche vaccinale en 1921. L'amélioration de l'hygiène de vie associée à la vaccination par le BCG ainsi que l'utilisation des antibiotiques (streptomycine en 1944, isoniazide en 1952, pyrazinamide deux plus tard, et enfin l'éthambutol et la rifampycine en 1962 et 1963 respectivement) ont permis le déclin progressif de la tuberculose dans les pays industrialisés. Pourtant, l'incidence mondiale de la tuberculose est en constante augmentation. Avec un tiers de la population mondiale porteur du germe sans forcément montrer de signes de la maladie, l'organisation mondiale de la santé considère la tuberculose comme un problème majeur de santé publique depuis 1993. Elle estimait en 2002 à deux millions, les morts dues à la tuberculose soit en moyenne un décès toutes les quinze secondes.

## **I.2) La tuberculose**

### I.2.1) Données épidémiologiques

L'état d'urgence mis en avant en 1993 par l'OMS et l'Union Internationale contre la Tuberculose et les Maladies Respiratoires a provoqué une prise en charge de l'épidémie à l'échelle mondiale, par l'établissement d'une stratégie dont l'abréviation anglosaxonne est « DOTS », pour Directly Observed Therapy Short Course. Elle consiste à détecter en priorité les cas à microscopie positive et à les soigner par un traitement approprié et efficace sous la forme d'une chimiothérapie standardisée de courte durée, sous une supervision médicale directe au moins pendant la phase initiale. L'objectif est de guérir 85% des cas détectés et de dépister au moins 70% des cas de la collectivité. En France, les chiffres mis à disposition par l'institut de veille sanitaire sont encourageants et montrent une baisse de l'incidence de 16,4 à 10,5 cas pour 10 000 habitants entre 1993 et 2002 (Che *et al.*, 2004). Par contre, bien que les métropolitains soient de moins en moins touchés, l'incidence de la tuberculose est croissante dans la population immigrante, phénomène révélateur de la persistance du fléau à l'échelle mondiale. En effet, la répartition mondiale des nouveaux cas de tuberculose est loin d'être

homogène, les pays pauvres étant extrêmement touchés par la maladie (Tableau I) (Van Helden, 2003). Le cas de l'Afrique est d'autant plus alarmant que l'incidence de la tuberculose y augmente de 6% par an. Dans les pays les plus pauvres, l'accroissement démographique, l'urbanisation rapide, l'absence ou l'implantation récente de programme national antituberculeux et la survenue de l'épidémie de SIDA explique cette augmentation de l'incidence déclarée de tuberculose.

**Tableau 1**

| <b>Estimations de l'incidence de la tuberculose et de la mortalité associée en 2002</b> |                               |                                   |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|
| Région de l'OMS   | Nombre de cas en milliers (%) | Décès par tuberculose             |
| Afrique   | 2354 ( <b>26</b> )            | 556 000 ( <b>83/100 000 hab</b> ) |
| Amériques   | 370 (4)                       | 53 000 (6/100 000 hab)            |
| Asie du sud-est   | 2890 ( <b>33</b> )            | 625 000 (39/100 000 hab)          |
| Europe  | 472 (5)                       | 73 000 (8/100 000 hab)            |
| Méditerranée orientale  | 622 (7)                       | 143 000 (28/100 000 hab)          |
| Pacifique occidental  | 2090 ( <b>24</b> )            | 373 000 (22/100 000 hab)          |
| <b>Ensemble du monde</b>  | <b>8797 (100)</b>             | <b>1 823 000 (29/100 000 hab)</b> |

( Données disponibles sur <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/fr/> )

Notamment, 31% des nouveaux cas de tuberculose en Afrique se sont déclarés chez des personnes atteintes par le VIH en 2000 (Corbett *et al.*, 2003). La sensibilité aux mycobactéries semble intimement liée à la réponse immunitaire de son hôte comme le montrent les différents degrés d'affection à la lèpre ou simplement la susceptibilité aux infections par les NTM. En cela, l'épidémie liée au VIH n'est pas sans conséquence sur la mortalité associée à la tuberculose dans le monde avec en moyenne 11% de morbidité due à celle-ci chez les individus HIV-positifs en 2000. En effet les sidéens présentent une progression plus rapide de la tuberculose. De plus, ils semblent plus susceptibles à cette infection qu'un individu sain et ont statistiquement plus d'infections par des souches résistantes à plusieurs antibiotiques de première ligne (Pour revue, Aaron *et al.*, 2004). Il semblerait que l'acquisition de l'immuno-déficiência liée au VIH puisse engendrer la réactivation de primo-infection « latente » par dérégulation des structures cellulaires qui permettaient jusqu'alors le contrôle de l'infection (§ 1.2.4).

La stratégie DOTS vise aussi à endiguer l'apparition de souches multi-résistantes aux antibiotiques de première ligne estimée en 2000 à 3,2% en moyenne et 10% dans certains

pays comme le Yémen ou l'Ukraine (Dye *et al.*, 2002). Une analyse statistique récente réalisée à Mexico, zone cependant initialement de faible incidence, indique un effet positif du DOTS sur les nouveaux cas de tuberculose recensés, aussi bien de souches résistantes que sensibles aux drogues de première ligne (DeRiemer *et al.*, 2005).

### 1.2.2) Infection et dépistage de *M.tuberculosis*

L'infection par *M.tuberculosis* se fait par les voies aériennes via l'inhalation de quelques bacilles présents dans les gouttelettes salivaires des aérosols générés par la respiration, la parole, le chant ou la toux de personnes développant une tuberculose. Au contact de l'air, ces gouttelettes se dessèchent en surface pour former de légères particules flottant dans l'atmosphère et contenant des bacilles viables pendant plusieurs heures. Les particules les plus fines atteignent les bronchioles jusqu'aux alvéoles ou s'initie le cycle infectieux suite à la phagocytose de ces particules par les macrophages présents à la surface des alvéoles pulmonaires de l'individu ainsi contaminé. Le chimiotactisme des cytokines produites par le macrophage infecté recrute d'autres cellules immunitaires et constitue le foyer initial. Les antigènes drainés par les cellules présentatrices vers les ganglions lymphatiques induisent l'activation de lymphocytes T spécifiques. Même si l'infection est contrôlée voire éradiquée, cette primo-infection peut être diagnostiquée. La réaction d'hypersensibilité retardée à la tuberculine, fraction protéique de *M.tuberculosis*, qui injectée en sous-cutanée provoque un œdème au point d'injection, reflète l'accumulation de lymphocytes mémoires sensibilisés lors de la primo-infection. On parle alors de populations PPD+ (Purified Protein Derivatives Positive) (IDR, 2004). Ce test présente cependant certaines limites; la vaccination par le BCG peut conduire dans certains cas à une réaction aspécifique et cette réaction est par ailleurs difficilement quantifiable chez des individus immuno-déprimés. Par ailleurs, au niveau du foyer initial se forme un tissu inflammatoire qui peut être détecté à la radiographie. Il est la preuve résiduelle de la présence de structures cellulaires granulomateuses calcifiées (§1.2.4). Des bacilles pouvant persister pendant plusieurs années, ce type d'analyse est demandé systématiquement pour intégrer professionnellement une collectivité infantile.

Une suspicion de tuberculose active (toux, cachexie) conduit à l'analyse bactériologique des produits pathologiques, produits d'expectorations pour les tuberculoses pulmonaires, ponctions ganglionnaires ou liquides céphalo-rachidien pour les tuberculoses extra-pulmonaires. Un frottis sur lame d'une parcelle du prélèvement sera réalisée pour

l'examen microscopique en utilisant des colorations particulières qui imprègnent la paroi du bacille riche en cires. La coloration de Ziehl-Neelsen utilise la fushine phéniquée chauffée. Le bacille est coloré en rouge et cette coloration résiste à l'acide et à l'alcool, d'où le nom de bacille acido-alcool résistants. La même particularité de résistance à la décoloration est observée avec un colorant fluorescent, l'auramine. L'examen microscopique est l'élément clef dans le diagnostic de la tuberculose pulmonaire mais les affections extra-pulmonaires sont habituellement pauvres en bacilles. Une amplification en milieu spécifique comme celui de Loewenstein-Jensen est alors nécessaire. Après trois semaines d'incubation, de grosses colonies sèches et rugueuses doivent être identifiées par tests biochimiques et notamment une activité catalasique thermolabile à 68°C, une activité nitrate réductase et l'accumulation de niacine, combinaison spécifique de *M.tuberculosis* (Tableau 2).

**Tableau 2**

| Mycobactéries         | Colonies | Niacine | Nitrate | Catalase 22°C | Catalase 68°C |
|-----------------------|----------|---------|---------|---------------|---------------|
| <i>M.tuberculosis</i> | R        | +       | +       | +             | -             |
| <i>M.bovis</i>        | S        | -       | -       | +             | -             |
| <i>M.bovis</i> BCG    | R        | -       | -       | +             | +             |
| NTM                   | V        | V       | V       | +             | +             |

(R = Rough ou Rugueuses ; S = Smooth ou Lisses ; V = Variable)

Les données concernant ce chapitre résument succinctement les informations disponibles sur le site web de l'union internationale contre la tuberculose et les maladies respiratoires : <http://www.tbrieder.org/>

### 1.2.3) La prévention et les traitements actuels

- La vaccination

Le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) constitue à ce jour le seul vaccin bactérien vivant atténué et en même temps le vaccin le plus utilisé à l'échelle mondiale. Cette souche vaccinale initialement obtenue en 1911 à partir d'une souche virulente de *M.bovis* après 39 passages sur des extraits de pommes de terre glycélinées biliées s'avéra désormais incapable de provoquer la mort de cobaye expérimentalement. Après 230 passages, le bacille n'était jamais redevenu virulent et s'était montré capable de protéger d'une infection virulente par le bacille tuberculeux, le cobaye, la souris, le bœuf, le cheval, le singe rhésus et le chimpanzé. Les premières tentatives de vaccination sur l'enfant furent initiées en 1921 à l'hôpital de la Charité à Paris sans incident remarquable. En 1924, la vaccination de 664 nourrissons permit d'estimer statistiquement la protection conférée par le BCG à hauteur de 90 % (Behr and Small, 1999). Ces chiffres encouragèrent l'utilisation de cette souche vaccinale en Europe puis dans le monde jusqu'à nos jours.

Les résultats d'une méta-analyse récente conclurent sur un effet globalement protecteur du BCG estimé à 50% vis à vis de l'infection par *M.tuberculosis* avec des pourcentages de protection particulièrement élevés en terme de mortalité (71%) mais aussi vis à vis des formes aigües, à savoir méningites (64%) et tuberculose miliaire (78%) (Colditz *et al.*, 1994). Pourtant, l'utilisation du BCG reste un sujet de controverse. Malgré de rares effets secondaires, son efficacité est remise en question car il ne garantirait pas la même protection contre les formes pulmonaires selon l'âge de la population vaccinée et surtout la latitude du pays considérée (Fine, 1995). En effet, la compétition avec d'autres mycobactéries environnementales plus à même de nicher dans les basses latitudes corrèle à la fois avec une meilleure immunité innée vis à vis de la tuberculose mais également avec une moins bonne efficacité de protection du BCG. Le même phénomène est observé entre milieu rural, propice aux contacts avec les mycobactéries environnementales, et le milieu urbain. Ainsi, le développement d'une immunité anti-mycobactérienne générale pourrait nuire à une réponse protectrice suite à la vaccination par le BCG en éliminant plus rapidement le bacille vaccinal aux dépens de l'établissement d'une protection plus spécifique vis à vis du bacille tuberculeux (Brandt *et al.*, 2002). S'ajoute à ce phénomène le fait que les souches et les préparations vaccinales diffèrent dans le monde, et que les conditions socio-économiques constituent un

facteur non-négligeable de propagation de la maladie (van Helden, 2003). Quoi qu'il en soit, même si les mycobactéries environnementales et le BCG confèrent une protection vis à vis de la tuberculose voire contre *M.leprae* pour le BCG (Zodpey *et al.*, 1999), ces protections restent partielles et l'établissement d'un vaccin universel contre la tuberculose passe par la recherche d'antigènes spécifiques efficaces pour l'établissement d'une bonne réponse immunitaire vaccinale.

Dans ce contexte, les vaccins sous-unités, ADN ou vivants atténués sont activement recherchés. Il devenait donc utile de s'intéresser aux modifications génétiques qui ont permis à la souche vaccinale de perdre sa virulence initiale, et de s'attacher à la recherche de déterminants antigéniques spécifiques du complexe tuberculosis pour pallier aux réactions croisées induites par les mycobactéries environnementales. Avant l'avènement du séquençage du génome, une technique d'hybridation génomique soustractive avait permis de déterminer trois régions à présence variable entre la souche vaccinale BCG et *M.bovis* nommées RD1 à RD3 pour Région de Différence (Mahairas *et al.*, 1996). Seule, la région RD1 est présente dans les souches virulentes humaines de *M.tuberculosis* et de *M.bovis* dont le BCG est originel. Plus tard, l'analyse du génome de *M.microti*, possédant un tropisme pour les rongeurs et utilisé en vaccination chez l'Homme, révélait la présence d'une délétion chevauchante à RD1 (Brodin *et al.*, 2002). Les gènes présents sur cette zone chevauchante sont apparus alors importants pour la pathogénie chez l'Homme. La réintroduction de la séquence correspondante d'H37Rv dans la souche vaccinale BCG induit une persistance accrue du bacille dans les poumons et la rate de souris immuno-déprimées par rapport à la souche de BCG naturellement déléetée (Pym *et al.*, 2002). Or cette région de différence contient des gènes codant des antigènes puissamment reconnus lors d'infection tuberculeuse dont notamment la protéine ESAT-6 qui est à la fois associée à l'enveloppe des mycobactéries et sécrétée dans le milieu de culture et qui est toujours exprimée par les souches virulentes de *M.tuberculosis*. Cet antigène possède deux avantages majeurs : (i) utilisé seul en tant que vaccin sous-unité avec un adjuvant particulier il égale la protection conférée par le BCG en modèle murin (Brandt *et al.*, 2000). (ii) Bien que cette protéine soit conservée chez les mycobactéries, son degré d'homologie est non significatif entre les mycobactéries commensales et celles du complexe tuberculosis (Demangel *et al.*, 2005). Ainsi la souche BCG:RD1 induit une réponse vis à vis d'ESAT-6 spécifique qui protège en modèle murin de l'infection ultérieure par *M.tuberculosis*. Contrairement aux travaux de Brandt (Brandt *et al.*, 2002), la protection du BCG:RD1 n'est cette fois pas altérée par une pré-sensibilisation à des

bactéries environnementales en modèle murin. Une telle souche pourrait constituer une bonne alternative de vaccination dans les zones de basse latitude où l'efficacité du BCG classique est remise en question. Il reste à déterminer si l'augmentation de sa persistance en modèle murin ne se révèle pas être un facteur de virulence chez l'Homme.

L'utilisation en vaccination dans nos latitudes du BCG, associé à l'amélioration de l'environnement socio-économique et à une antibiothérapie adaptée, a largement contribué au déclin de la maladie. Malheureusement, l'usage des antibiotiques en général laisse rapidement place à une sélection naturelle de micro-organismes résistants à ces molécules.

- Les traitements

Le traitement de la tuberculose se distingue de la plupart des infections bactériennes de par un temps de génération élevé du bacille et par sa capacité à entrer dans une phase de « dormance », laquelle se caractérise par une activité métabolique réduite qui limiterait l'action des antibiotiques. En effet, lors d'infections animales expérimentales, 118 jours de traitements par des antituberculeux ne suffisaient pas pour éradiquer les bacilles viables des organes infectés (McCune *et al.*, 1956). En 1952, l'analyse histologique de lésions tuberculeuses laissait apparaître à la microscopie des bacilles acido-alcoolo résistants pourtant non cultivables (Wayne and Sohaskey, 2001). Parallèlement, le temps d'incubation de la maladie estimé par le temps nécessaire à l'obtention d'un test tuberculinique positif s'étendrait sur la vie entière de l'individu, amenant la notion de pathologie latente via la présence de bactéries ou particules non répliquatives (NRP) (Wayne and Sohaskey, 2001). Or la croissance du bacille de Koch est sensible à la concentration en oxygène. Le processus pathologique montre la présence de bactéries à la fois à la surface des cavités pulmonaires en milieu aérobie mais également au sein de granulomes, structures cellulaires faiblement vascularisées (§1.2.5), qui contiennent au centre une matière caséuse acide et dépourvue d'oxygène (Wayne and Sohaskey, 2001). Les thérapies anti-tuberculeuses doivent donc être adaptées à ces différences physiologiques. De plus, il faut noter le pH relativement bas qui régnait dans la nécrose caséuse comme dans toute région inflammatoire et qui peut conditionner l'activité de certains antibiotiques. (Gillespie, 2002). Par ailleurs, les mycobactéries possèdent une enveloppe complexe, très hydrophobe, à perméabilité réduite vis à vis d'un grand nombre de composés qui corrèle à une résistance naturelle à de nombreux antibiotiques (Jarlier and Nikaido, 1994). Enfin l'annotation du génome de *M.tuberculosis*

laisse apparaître la présence d'enzymes de modification comme des  $\beta$ -lactamases et des systèmes d'efflux qui contribueraient à la résistance primaire à certains antibiotiques (Cole *et al.*, 1998).

Malgré cela, la tuberculose est efficacement traitée dans 95% des cas, suite à l'association de plusieurs antibiotiques sur une longue période de 6 mois minimum : Isoniazide (INH), Rifampicine (RIF) et Pyrazinamide (PZA) pendant les deux premiers mois puis INH et RIF pour finir le traitement. Un quatrième antibiotique est associé pour les zones d'endémie où l'incidence de résistance primaire à l'INH est supérieure à 4%. Il en est de même, pour des patients ayant été traités au préalable par ces anti-mycobactériens et également en cas d'antécédent de contact avec un malade infecté par une souche détectée ou suspectée résistante. Cette quatrième molécule peut être l'éthambutol pour les adultes, son administration est associée à une surveillance mensuelle de l'acuité visuelle. La streptomycine est utilisée pour les enfants chez qui cette surveillance est délicate. Il existe d'autres molécules utilisables dans des circonstances précises contre-indiquant l'usage de ces antibiotiques de première ligne, comme une grossesse, une insuffisance rénale ou hépatique, le syndrome d'immunodéficience acquise ou une résistance multiple à ces molécules (Pour revue, Frieden *et al.*, 2003).

L'isoniazide, hydrazine de l'acide nicotinique, est une pro-drogue qui nécessite une activation par une catalase-peroxydase (*katG*) pour aboutir à la formation d'un adduit covalent du co-facteur NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduit). Ce co-facteur ainsi non métabolisable vient inhiber une réaction enzymatique dépendante du NADH catalysée par une énoyl-ACP réductase de *M.tuberculosis*, InhA (Rozwarski *et al.*, 1998). Cette enzyme catalyse la réaction de réduction de la double liaison d'une chaîne grasse en élongation qui a lieu lors du métabolisme lipidique. Elle fait partie d'un complexe multi-protéique particulier responsable de la biosynthèse d'acides gras à longue chaîne : FAS II pour Fatty Acid Synthase II qui utilise comme précurseurs les acides gras classiques (C16-C18) produits par une protéine multi-fonctionnelle, le système FAS I (Marrakchi *et al.*, 2000). Les acides gras issus du complexe FAS II sont les précurseurs des acides mycoliques, composants majeurs et essentiels de l'enveloppe des mycobactéries. L'importance de ces lipides est soulignée par l'action d'autres antibiotiques de seconde ligne qui altèrent également la biosynthèse de ces acides gras propres aux *Corynebacterineae* comme l'éthionamide (ETH : pro-drogue activée par le produit du gène *ethA*), et le triclosan (TCL) en

inhibant spécifiquement l'activité d'InhA (Kremer *et al.*, 2003). L'INH est particulièrement utile dans les phases précoces du traitement au cours desquelles elle réduit considérablement la charge bactérienne pulmonaire en s'attaquant aux bactéries des cavités pulmonaires métaboliquement actives et à forte croissance aérobie. En effet, la biosynthèse des acides mycoliques est directement liée à la croissance bactérienne et ne concerne pas les mycobactéries latentes.

La rifampicine, antimicrobien de la famille des rifamycines, est une molécule semi-synthétique introduite en thérapie dès 1967. Comme toutes les rifamycines, elle inhibe la transcription des ARNm en interagissant avec la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase codée par le gène *rpoB* chez H37Rv (Gillespie, 2002). Cette interaction aboutit à une inhibition de la transcription. En plus d'être bactéricide sur des mycobactéries métaboliquement actives, la rifampicine présente une excellente activité sur des bacilles latents. Elle a largement contribué à diminuer la longueur des traitements à 6 mois. La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est de 5 ng à 0.2  $\mu\text{g}$  par ml alors que les concentrations sériques peuvent atteindre 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  lors d'une posologie normale. Elle constitue malheureusement un puissant inducteur enzymatique qui minimise les concentrations sériques d'autres molécules comme les inhibiteurs de protéases anti-rétroviraux, certains contraceptifs oraux, certains anticoagulants et corticoïdes. La contre-indication de son association avec les anti-rétroviraux est particulièrement gênante suite à l'incidence élevée des co-infections par *M.tuberculosis* et le VIH. La sélection d'une simple mutation ponctuelle dans une région conservée affectant les codons 507 à 533 de *rpoB* confère une résistance importante à cet antibiotique (Somoskovi *et al.*, 2001).

La pyrazinamide est, comme l'INH, une pro-drogue qui nécessite une activation enzymatique par une pyrazinamidase identifiée chez *M.tuberculosis* comme étant PncA et qui catalyse la formation de la molécule active : l'acide pyrazinoïque (Frothingham *et al.*, 1996). Ce dérivé synthétique de la niacine (Vitamine B3) possède un puissant effet stérilisant sur des bactéries latentes et n'est efficace qu'en milieu acide. Il est donc parfaitement adapté pour atteindre les bacilles présents dans le caséum. La cible de cet antibiotique s'est révélée être l'homologue d'*E.coli* du système FAS I impliqué dans la biosynthèse classique des acides gras (Zimhony *et al.*, 2000). La souche de *M.tuberculosis* est sensible à ce dérivé, contrairement à d'autres mycobactéries qui possèderaient un système de transport actif permettant d'expliquer la résistance de ces souches malgré l'intégrité de *pncA* (Raynaud *et*

*al.*, 1999). Une nouvelle fois, l'utilisation de cet antibiotique a sélectionné diverses formes mutées de PncA qui ne métabolisent plus la pro-drogue et confèrent une résistance à la PZA aux souches qui les portent (Lemaitre *et al.*, 1999).

L'éthambutol (EMB ; dextro-2,2'-(éthylène-diimino)-di-1-butanol) est un inhibiteur spécifique de la biosynthèse de l'arabinogalactane, constituant structural de l'enveloppe mycobactérienne. L'arabinogalactane est un polymère osidique covalamment associé au peptidoglycane sous-jacent (§1.3.1). Il sert notamment d'ancrage aux acides mycoliques. L'activité de l'éthambutol fut démontrée pour la première fois par l'inhibition du transfert de D-arabinose marqué sur un accepteur oligosaccharidique, à partir d'un extrait acellulaire d'une souche de *M.smegmatis* sensible à l'éthambutol (Takayama and Kilburn, 1989). Cette découverte a permis d'interpréter l'inhibition indirecte du transfert des acides mycoliques sur l'arabinogalactane observée auparavant. Par la suite, les arabinosyls transférases ciblées par cet antibiotique ont pu être identifiées. La surexpression hétérologue de deux arabinosyl-transférase de *M.avium* dans *M.smegmatis* induit une résistance à l'EMB par l'effet de multiplication de la cible (Belanger *et al.*, 1996). Ces protéines sont codées par un opéron contenant les gènes *embA*, B et C. Cet opéron est régulé au niveau transcriptionnel par le régulateur EmbR. L'action de l'EMB va donc permettre la déstructuration de l'enveloppe externe de la mycobactérie et ainsi améliorer la pénétration et donc l'activité des rifamycines associées en thérapie. Des résistances à cet antibiotique sont décrites dans 4% des isolats cliniques. Elles sont majoritairement représentées par des mutations ponctuelles du gène *embB* qui induisent un changement de la structure primaire au niveau des résidus 306 ou 406. D'autres polymorphismes nucléotidiques associés à une résistance à l'EMB bien que moins fréquents ont également été caractérisés (Ramaswamy *et al.*, 2000).

L'apparition à l'échelle mondiale de souches résistantes à au moins deux, voire la totalité de ces antibiotiques de première ligne est très alarmante et rend le traitement de telles infections particulièrement délicat. En effet, les thérapies alternatives utilisent l'association orale d'au moins trois drogues de seconde ligne plus une injectable pour lesquelles le bacille s'avère sensible. Le temps de génération élevé complique considérablement l'établissement d'antibiogramme classique réalisé sur milieu sélectif. Le développement des techniques de biologie moléculaire en particulier de la PCR, permet la détection rapide de la nature de la plupart des résistances caractérisées dans le cas de mutations ponctuelles et la mise en place dès lors, d'une thérapie adéquate. Ces technologies de pointe, coûteuses, ne sont pas toujours

disponibles dans les pays les plus touchés. Moins efficaces, les antibiotiques de seconde ligne prolongent considérablement le traitement jusqu'à 24 mois en moyenne ; de plus, ils induisent des effets secondaires particulièrement néfastes à cause de leur toxicité pour l'organisme (Revue dans Frieden *et al.*, 2003).

#### 1.2.4) Le macrophage à la base du processus pathologique

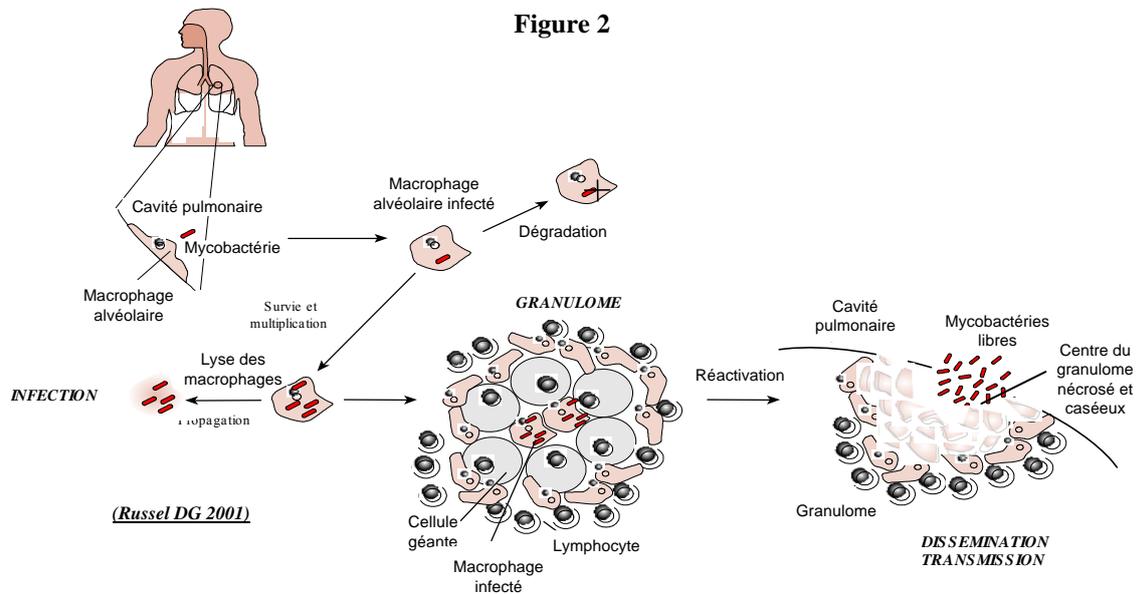
L'étape de phagocytose par les macrophages alvéolaires apparaît primordiale dans le processus pathologique de *M.tuberculosis* à la vue des résultats obtenus en modèle murin suite à leur déplétion sélective. De telles souris déplétées survivent mieux aux infections expérimentales, et la multiplication du bacille dans leurs poumons semble affectée (Leemans *et al.*, 2001). En effet, ce processus de phagocytose, censé éliminer la particule infectieuse par la mise en place de mécanismes bactéricides, est détourné par *M.tuberculosis*. En fait, les bactéries se retrouvent présentes au sein d'un compartiment intra-cellulaire nommé phagosome, dans lequel elles semblent capables de survivre et de se multiplier. Ceci s'expliquerait par le fait que la maturation classique de ce compartiment en endosome tardif puis en phagosome semble être inhibée, et ce, particulièrement à l'étape de fusion avec les vésicules lysosomiales (Armstrong and Hart, 1971). Par la suite, des résultats expérimentaux notables dans ce domaine montraient en immunocytochimie couplée à la microscopie électronique, que des bactéries présentées vivantes à des macrophages n'étaient globalement pas retrouvées dans des vésicules acides, contrairement à des particules infectieuses préalablement tuées (Crowle *et al.*, 1991). La compréhension de ce phénomène a suscité de nombreux travaux qui ont permis d'élucider en partie la composition et le trafic autour de ce compartiment. Ainsi, le bacille tuberculeux persisterait en se multipliant dans un compartiment comparable à un endosome précoce qui comprend, dans de faibles proportions, des marqueurs glycoprotéiques lysosomaux comme le CD63, LAMP1 et 2 et la protéase acide, cathepsine D (Clemens and Horwitz, 1995). Il est cependant notable que des événements de fusion membranaire avec des vésicules d'endocytose et de recyclage ont toujours lieu à ce stade pour permettre un apport nutritionnel et fournir les constituants membranaires nécessaires à l'expansion du phagosome face à la multiplication des bactéries qui y résident (Clemens and Horwitz, 1996). Il semble cependant nécessaire d'intégrer le rôle du macrophage dans un contexte plus global faisant notamment intervenir les différentes populations lymphocytaires, puisque l'opsonisation de *M.tuberculosis* favorise la fusion phagosome-lysosome sans pour autant altérer la multiplication des bacilles (Armstrong and

Hart, 1975). En fait, contrairement à certains pathogènes mycobactériens comme *M.ulcerans*, aucune sécrétion de toxine ne semble intervenir dans la pathogénie de la tuberculose. Mais c'est l'hôte, qui face à l'échappement aux mécanismes bactéricides du macrophage et à la multiplication intra-macrophagique du bacille de Koch, réagit par une réponse immunitaire aigüe à l'origine des séquelles inflammatoires et nécrotiques de la pathologie.

#### 1.2.5) La transmission du BK, du parasitisme aux manifestations pathologiques

A ce stade de connaissance, le macrophage semble constituer le foyer idéal pour le développement de *M.tuberculosis*. Pourtant, sur 100% des individus statistiquement infectés, seuls 30% semblent primo-infectés et présentent un test tuberculinique positif (PPD+). Cela signifie que dans 70% des cas, une réponse immunitaire innée est malgré tout capable d'éradiquer la particule infectieuse. Deux arguments peuvent être avancés pour souligner l'importance de l'immunité innée dans l'éviction de la primo-infection. D'une part, la vaccination par le BCG, à l'origine comme tout vaccin d'une immunité adaptative, protège mal des formes pulmonaires mais protège bien des formes disséminées résultantes ultérieures des primo-infections (Colditz *et al.*, 1994). D'autre part, la réponse apoptotique des macrophages alvéolaires humains est induite suite à l'infection *in vitro* par *M.tuberculosis* et constitue vraisemblablement une réponse effectrice pour l'éradication du bacille que les souches virulentes tentent de détourner (Keane *et al.*, 2000).

Toutefois, le fait que *M.tuberculosis* puisse échapper aux réponses bactéricides du macrophage, conduit à une primo-infection dans 30% des cas. Le macrophage débordé tente d'activer ces fonctions bactéricides par une sécrétion autocrine de TNF $\alpha$ . Cette chimiokine permet le recrutement paracrine de lymphocytes et monocytes qui après diapédèse, vont s'organiser en follicule ou granulome pour contenir les particules infectieuses (Figure 2) (Saunders and Cooper, 2000). L'analyse histologique de ce follicule dit « épithélio-gigantofolliculaire » révèle qu'il se compose en son centre de cellules épithélioïdes (monocytes à noyau ovoïde) et de cellules de Langhans, résultante de la fusion de cellules épithélioïdes, à noyaux multiples en forme de fer à cheval, et d'une couronne de lymphocytes. L'évolution caractéristique du follicule tuberculeux conduit à une nécrose centrale épaisse et laiteuse dites caséuse qui peut se fibroser par l'accumulation de collagène produit par les fibroblastes environnants, voire se calcifier pour donner ces images typiques de nodules à la radiographie des poumons (Ait-Khaled and Enarson, 1999).



**Représentation schématique cellulaire des différentes étapes de l'infection humaine par *M.tuberculosis* :**

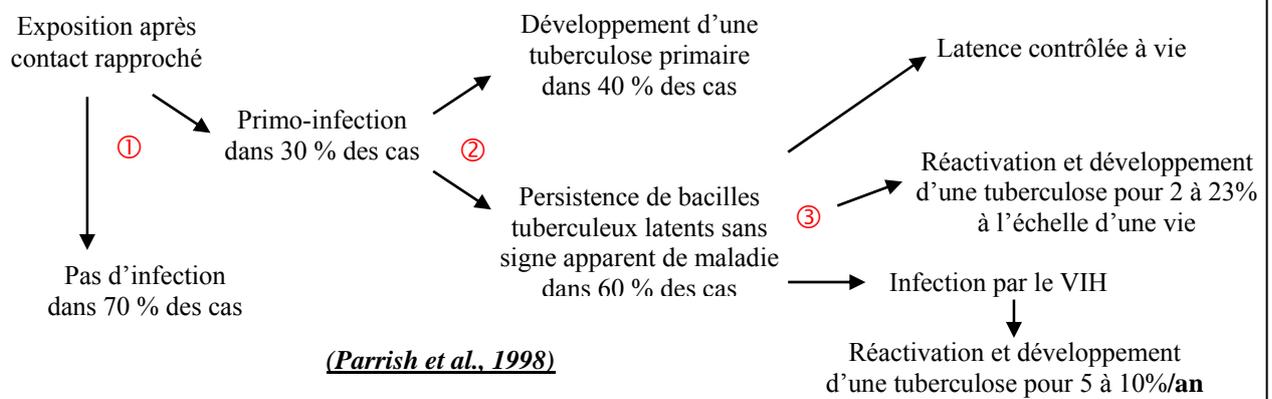
Le macrophage alvéolaire phagocyte le bacille préalablement inhalé. Quand la réponse bactéricide est inefficace, le bacille se multiplie au sein du macrophage. L'activation du macrophage permet le recrutement des monocytes et lymphocytes circulants qui s'organisent pour former un granulome et circonscrire l'infection. Des particules non répliquatives (NRP) y persistent et peuvent, suite à une déstructuration du granulome être libérées et réinitier un processus infectieux vers une tuberculose active.

L'organisation du granulome permet, en plus de contenir le foyer infectieux, l'orchestration du champ de bataille par les lymphocytes T qui le circonscrivent. Notamment, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> seraient vraisemblablement capables d'induire l'apoptose des macrophages infectés, détruisant ainsi l'habitat du bacille mais semblant également réduire sa viabilité (Oddo *et al.*, 1998). Cette réponse granulomateuse permet de contrôler la primo-infection pour 30% des individus infectés sans pour autant éradiquer les bactéries. En effet, des bactéries peuvent persister au sein des macrophages ou dans le caséum confinées au centre du granulome, générant un potentiel pathogénique latent. Statistiquement, à ce stade, pour 4 personnes sur 10, la réponse granulomateuse ne suffit pas pour contrôler l'infection et elles développent immédiatement une tuberculose active dite primaire suite à la liquéfaction et la déstructuration du granulome (Figure 2). Les bactéries se répandent et de nouveaux foyers apparaissent. La nécrose des tissus contaminés peut aboutir à la formation d'ouvertures dans la cavité pulmonaire, qui, dans certains cas très avancés, sont appelées « cavernes ». Les bactéries résiduelles peuvent se disséminer dans le reste des poumons voire dans l'organisme si les cavités communiquent avec la circulation sanguine.

Pour les individus contrôlant l'infection, les bactéries asphyxiées semblent subsister sans se multiplier dans un état de persistance non réplivative (NRP) (Wayne and Sohaskey, 2001). Elles conservent un métabolisme toujours actif puisqu'une chimioprophylaxie par des antibiotiques ciblant le métabolisme réduirait jusqu'à 90% le taux de réactivation (Parrish *et al.*, 1998). L'existence de ce réservoir permet à la pathologie de resurgir plusieurs années après la primo-infection suite à une perte du contrôle liée à une déstructuration de ce granulome. Les mécanismes et les raisons de cette réactivation restent encore mal compris mais pourrait faire intervenir l'âge, le stress ou la malnutrition (Figure 3).

Cependant, l'équilibre semble intimement lié à l'intégrité de la réponse immunitaire nécessaire à la constitution du granulome et sa stabilisation. En effet, le dialogue de chimiokines entre macrophage et lymphocytes T CD4<sup>+</sup> semble important pour maintenir l'intégrité du granulome. En particulier, l'interféron- $\gamma$  sécrété notamment par les lymphocytes T qui entourent le follicule paraît primordial étant donnée la sensibilité exacerbée de souris knockout INF $\gamma$ <sup>-/-</sup> aux infections par *M.tuberculosis* (Cooper *et al.*, 1993).

**Figure 3**



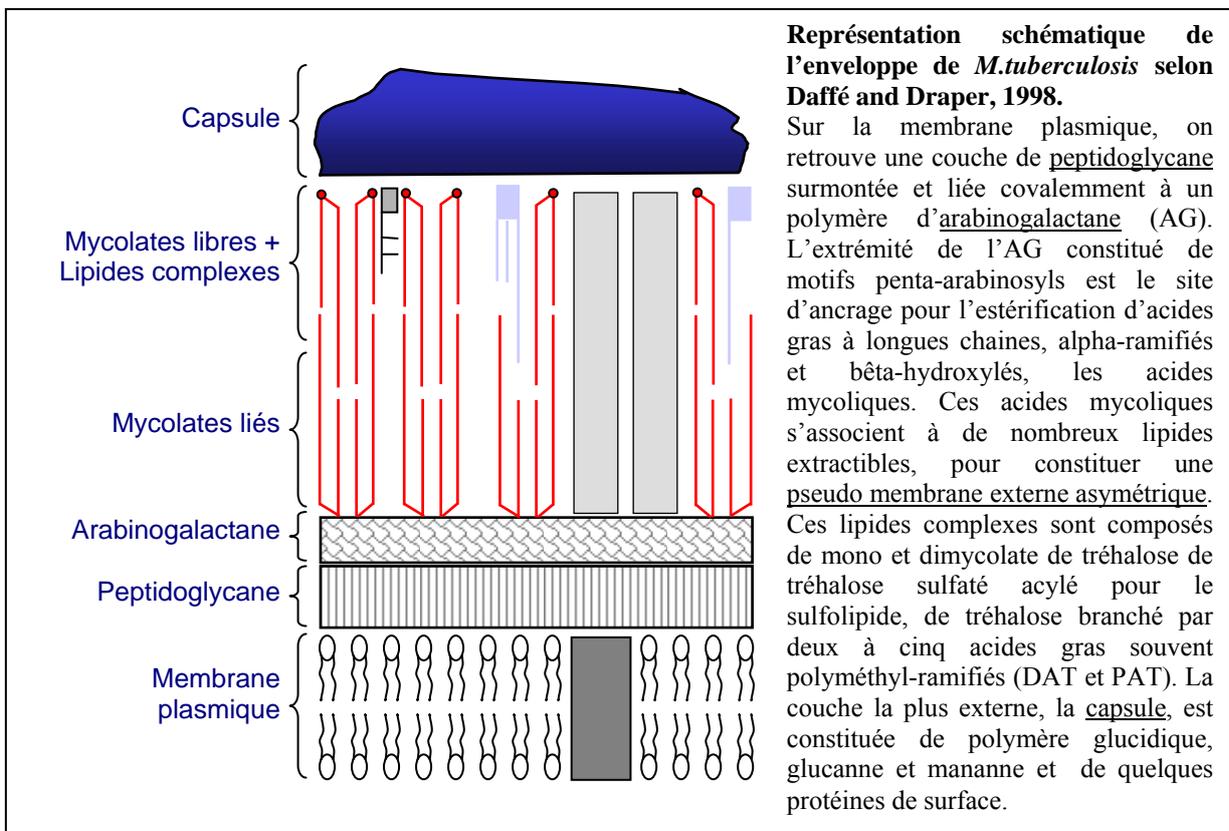
**Diagramme schématisant les probabilités d'accéder aux différents stades pathologiques de la tuberculose suite à un contact propice à la contamination. Trois étapes majeures se distinguent : la contamination, la latence et la réactivation. Noter la fréquence accrue de réactivation suite à l'infection par le VIH.**

D'ailleurs chez l'Homme, des susceptibilités mendéliennes relatives aux récepteurs macrophagiques à l'INF $\gamma$  et également au récepteur lymphocytaire à l'IL12 sont associées à une sensibilité accrue aux infections mycobactériennes (Pour revue, Casanova, 2001). De plus, l'implication du CD4 dans l'établissement du granulome chez la souris KO CD4 $^{-/-}$  a également été démontrée (Lawn *et al.*, 2002; Saunders *et al.*, 2002). Or lors d'immuno-déficience acquise suite à l'infection par le VIH, la déplétion progressive des populations lymphocytaires CD4 $^{+}$  permettrait d'expliquer la fréquence importante de tuberculose chez ces individus (Lawn *et al.* 2002). Cette population séropositive serait donc moins à même de contenir une primo-infection antérieure (Figure 3).

Avec un tiers de la population mondiale infectée, le nombre de cas latents prêt à ressurgir est par conséquent considérable ; il minimise les possibilités d'éradiquer la maladie à court terme par une stratégie de vaccination efficace. De plus, une proportion importante de ce réservoir est *a fortiori* d'ores et déjà résistant à la chimiothérapie actuelle et souligne la nécessité de développer de nouvelles molécules anti-tuberculeuses.

Deux des antibiotiques de première ligne ciblent une voie métabolique d'un composé de l'enveloppe mycobactérienne. Cette observation met en exergue l'importance de cette structure dans l'intégrité et la viabilité des mycobactéries. Extrêmement riche en lipide, elle représente à elle seule jusqu'à 60% du poids sec de la bactérie (Daffe and Draper, 1998). D'ailleurs, l'analyse du génome de *M.tuberculosis* révèle un investissement considérable des mycobactéries dans la biosynthèse lipidique en général avec un nombre de gènes fonctionnellement associé à ce métabolisme cinq fois plus important que chez *E.coli* (Cole *et al.*, 1998). La biosynthèse des lipides bactériens constitue un champ d'investigation prometteur pour le développement de nouvelles drogues (Heath *et al.*, 2001). De plus, l'enveloppe est à l'interface directe entre le pathogène et son hôte humain. Elle constituerait donc un élément majeur dans le traitement et la pathogénie du bacille tuberculeux en conférant non seulement une résistance accrue aux antibiotiques mais également une structure protectrice à l'environnement hostile du phagolysosome. Enfin, elle abrite vraisemblablement des facteurs de virulence favorables à sa survie qui conditionneraient en l'occurrence sa voie d'entrée dans le macrophage et la régulation des événements de trafic intra-cellulaire pour inhiber la maturation de son compartiment en lysosome (Fratti *et al.*, 2003).

**Figure 4**



### I.3) L'enveloppe et ses composés dans la pathogénicité de *M.tuberculosis*

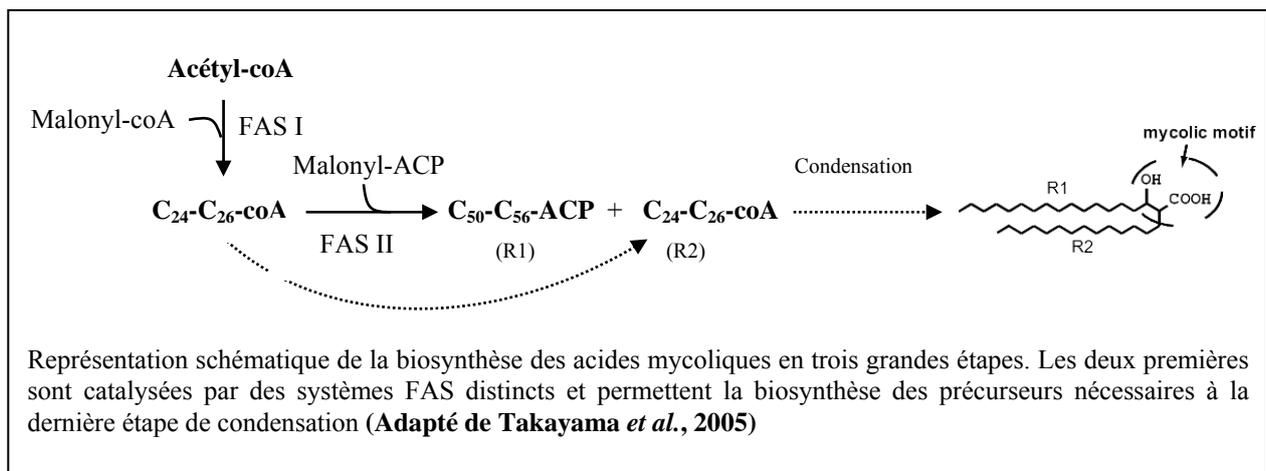
#### I.3.1) L'enveloppe mycobactérienne (Pour revue, Daffe and Draper, 1998)

Les mycobactéries sont analysées positifs à la coloration de Gram. Pourtant, l'organisation de leur enveloppe rappelle plus celles des bactéries Gram négatifs (Figure 4). En effet, on peut décrire succinctement l'enveloppe d'une mycobactérie, de la membrane plasmique vers le milieu extra-cellulaire, comme suit. Surmontant, la membrane plasmique et communément à toutes les bactéries, se trouve une couche de peptidoglycane qui se distingue de celui des entérobactéries par la présence de molécules d'acide N-glycolylmuramique en remplacement de l'acide N-acetylmuramique (Azuma *et al.*, 1970).

Ensuite, l'arabinogalactane (AG), dont la biosynthèse a été précédemment décrite comme cible de l'EMB, est covalamment associé au peptidoglycane par liaison phosphodiester. Sa structure est originale par le fait d'être composée uniquement d'unités galactose et arabinose cyclisées en furane, forme cyclique très peu répandue dans le monde vivant du galactose. Schématiquement, l'AG comprend un domaine linéaire de Galf, lié alternativement en  $\beta(1\rightarrow5)$  et  $\beta(1\rightarrow6)$ , ramifié par un enchainement linéaire d'Araf liés en  $\alpha(1\rightarrow5)$  qui se ramifie à nouveau pour former les motifs penta-arabinsyls terminaux de l'AG (Pour revue, Chatterjee, 1997). Ces motifs servent d'ancrage pour l'estérification des acides mycoliques. Deux tiers des unités arabinsyls des motifs terminaux de l'AG seraient ainsi estérifiées par des mycolates. Ces acides gras, alpha-ramifiés et bêta hydroxylés comprenant de 70 à 90 atomes de carbone chez *M.tuberculosis*, s'orienteraient perpendiculairement à la membrane plasmique (Jarlier and Nikaido, 1994). Ils constituent une épaisse surface hydrophobe solidement attachée sur laquelle repose une deuxième couche de lipides de natures diverses, qui sont dits « extractibles » car uniquement associés par leur hydrophobicité à la couche inférieure. Ainsi ces deux couches de lipides formeraient une pseudo-bicouche asymétrique comparable à la membrane externe des bactéries Gram- et dont l'épaisseur est remarquable. De plus, la présence de porines traversant cette épaisse couche lipidique est encore à l'image des bactéries Gram- (Pour revue, Niederweis, 2003). Enfin, on retrouve à la surface externe de la bactérie une capsule essentiellement composée de polymères glycosidiques de D-glucane mais également D-arabinomannane et quelques traces de D-mannane (Lemassu and Daffe, 1994). Dépourvue de lipides, cette capsule recèle quelques protéines immunogènes impliquées dans l'adhésion cellulaire du bacille comme les antigènes 85, qui présentent un domaine de liaison à la fibronectine, et la protéine HBHA, pour Heparin Binding HemAgglutinin (Menozzi *et al.*, 1996; Ortalo-Magne *et al.*, 1995).

L'enveloppe de *M.tuberculosis* apparaît cruciale à la fois dans le traitement de la tuberculose mais également dans la pathogénicité du bacille. En effet, la structure remarquable de la paroi des mycobactéries contribuerait notablement à leur résistance naturelle aux antibiotiques (Jarlier and Nikaido, 1994). De plus, et comme nous le verrons dans le prochain chapitre, la diversité des lipides qui la compose est une source d'antigènes et de facteurs de virulence dont la nature et l'origine ont pu - pour certains d'entre eux - être élucidées.

**Figure 5**



### I.3.2) Structure et fonction des lipides impliquées dans la virulence de *M.tuberculosis*

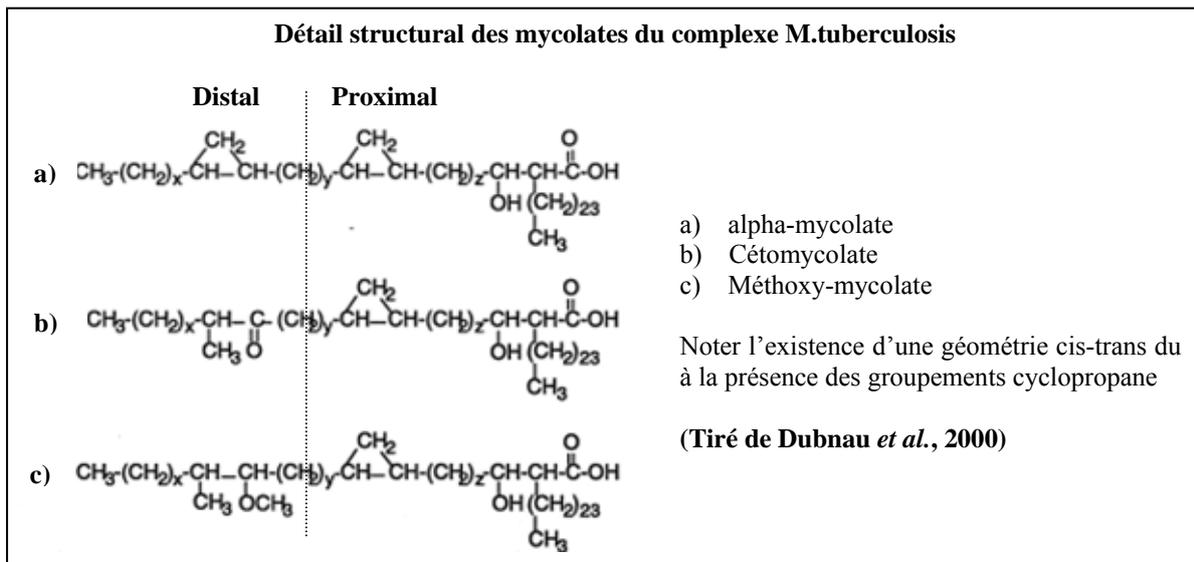
#### **I.3.2.1) Les acides mycoliques et leurs décorations**

Les acides mycoliques sont des acides gras à longues chaînes,  $\alpha$ - ramifiés et  $\beta$ -hydroxylés (Kremer *et al.*, 2000). Ces lipides particuliers peuvent être soit rattachés au squelette pariétal de la mycobactérie estérifiés à l'arabinogalactane (§I.3.1), soit estérifiés en position 6 à un dimère d' $\alpha$ -gluco-pyranosyl lié en (1 $\rightarrow$ 1), le tréhalose. Ces esters de tréhalose contribuent sur sa face externe, à la formation de la pseudo-bicouche asymétrique de l'enveloppe des mycobactéries (Figure 5). Ainsi, on retrouve essentiellement deux types de lipides extractibles contenant des mycolates. Le dimycolate de tréhalose (DMT ou Cord-Factor : CF) et son précurseur, le monomycolate de tréhalose (MMT) sont constitués d'une molécule de tréhalose estérifiée - comme leur nom le suggère - par une ou deux molécules d'acide mycolique.

La biosynthèse des acides mycoliques, puisque cible de l'INH et de l'ETH, est essentielle pour les mycobactéries. Un grand nombre de travaux ont permis d'élucider leur voie métabolique ces vingt dernières années (Pour revue, Takayama *et al.*, 2005). Ce lipide particulier résulterait d'une condensation de deux acides gras issus de systèmes FAS (Fatty Acid Synthase) distincts, FAS I et FAS II (figure 5). Le plus court (C<sub>24</sub>-C<sub>26</sub>) est produit *de novo*, par un homodimère d'une protéine multi-domaine : FAS I. Ce système réalise des condensations successives de malonyl-coA et allonge ainsi la molécule d'acétyl-coA initial par unités de deux carbones. Le deuxième substrat nécessaire pour la condensation est appelé « chaîne méromycolique ». Particulièrement longue chez *M.tuberculosis*, sa synthèse nécessite un système particulier : le système FAS II. Bien que fonctionnellement comparable au système FAS I, il s'en distingue par la séparation physique des différents domaines catalytiques sur des polypeptides distincts dont InhA, la cible de l'INH, fait partie. De plus, FAS II ne réalise pas de synthèse *de novo* et utiliserait comme précurseur un produit de FAS I. L'élongation se ferait sur une protéine porteuse, ACP<sub>M</sub> jusqu'à l'obtention d'une chaîne grasse en C<sub>50</sub>-C<sub>56</sub>. Ces deux produits seraient donc condensés par une réaction de type Claisen (dont la nature restait indéterminée jusqu'à l'établissement de ce travail (§II.2.1)), ce qui permettrait d'aboutir, après réduction, à la molécule finale d'acide  $\alpha$ - ramifié et  $\beta$ -hydroxylé.

Le transfert des acides mycoliques sur le tréhalose a été relié *in vitro* à l'activité de trois protéines de surface antigéniques, les antigènes 85 A, B et C, nommées antérieurement *fbpA*, B et C par la présence d'un domaine de liaison à la fibronectine (Belisle *et al.*, 1997).

**Figure 6**



*In vivo*, ces protéines semblent plutôt impliquées dans le transfert des mycolates sur l'arabinogalactane. En effet, l'inactivation du gène *csp1* codant PS1, une protéine de *C.glutamicum*, homologue aux antigènes 85 de *M.tuberculosis*, provoque une diminution de 50% des mycolates liés à l'AG dans la corynébactérie recombinante (Puech *et al.*, 2000). Or, cette diminution peut être compensée par la réintroduction en *trans* des gènes codant les antigènes 85 de *M.tuberculosis*. De plus, l'inactivation de l'antigène 85C dans *M.tuberculosis* diminue de 40% le taux d'estérification de l'AG par des acides mycoliques (Jackson *et al.*, 1999). La quantité résiduelle de mycolates liés n'est alors plus suffisante pour recouvrir la totalité de la surface de la mycobactérie et serait à l'origine d'une augmentation importante de la perméabilité à des petites molécules tant hydrophiles qu'hydrophobes. A nouveau, cette déficience est compensée par la réintroduction en *trans* des différents gènes codant les antigènes 85. Cette apparente redondance fonctionnelle est modérée par une plus faible activité compensatoire de l'antigène 85B *in vivo*, qui montrait déjà une plus faible activité *in vitro*, dans l'étude de Beslisle en 1997. Or, la perte du gène *fbpB* n'influe pas sur la proportion de mycolates transférés sur l'AG, mais la souche délétée se montre affectée pour la survie en modèle cellulaire de phagocytose (Armitige *et al.*, 2000; Puech *et al.*, 2002). A l'inverse, une souche délétée au niveau de *fbpC* présente une baisse de 40% des acides mycoliques liés à l'arabinogalactane. Pourtant, la survie de la souche une fois phagocytée *in vitro* ne semble pas affectée (Jackson *et al.*, 1999). En dépit d'une apparente redondance fonctionnelle, seul l'antigène 85C semble crucial pour le transfert des acides mycoliques sur l'arabinogalactane. Par contre, et pour des raisons encore obscures, seul l'antigène 85B est important pour la survie des mycobactéries au sein du macrophage. Ces protéines ont un pouvoir immunogène important et sont l'objet d'études en première phase d'essai clinique pour la conception de nouveaux vaccins (Revue notamment par, Doherty, 2005).

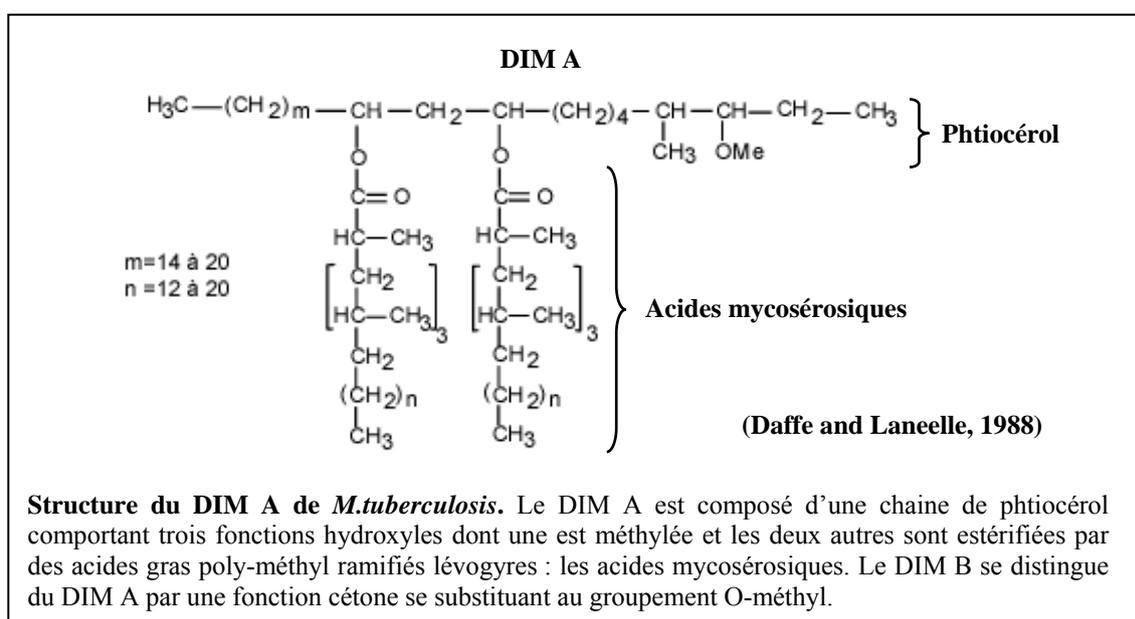
Lors de l'élongation par FAS II de la chaîne méromycolique ont lieu de subtiles modifications enzymatiques, aboutissant à la formation de molécules légèrement différentes. Ainsi, le terme de « décoration » est utilisé pour décrire les groupements méthyl, céto, méthoxy et cyclopropane présents sur la chaîne principale des mycolates (Figure 6). Ces modifications structurales apparaissent dans deux régions de la chaîne méromycolique appelées distale et proximale en référence à leur distance de la fonction hydroxyle en  $\beta$ . Les modifications polaires sont préférentiellement localisées dans la partie distale (Pour revue, Kremer *et al.*, 2000).

La caractérisation des enzymes impliquées dans la formation de ces décorations a permis d'évaluer leur contribution dans la pathogénie via la construction de souches recombinantes délétées au niveau de gènes qui les codent. Par exemple, une différence notable entre *M.tuberculosis* et la souche non pathogène de référence *M.smegmatis* réside dans la formation restrictive par la souche pathogène de décoration cyclopropane distale et proximale (Figure 6). Or, l'introduction du gène *cma1* de *M.tuberculosis* dans *M.smegmatis* instaure de manière non spécifique la production de mycolates ainsi décorés en position distale, et confère à la souche recombinante une résistance accrue aux radicaux libres oxygénés. Les auteurs avancent un intérêt fonctionnel pour *M.tuberculosis* de générer ces décorations pour une meilleure résistance au stress oxydatif subi dans l'environnement hostile du phagolysosome (Yuan *et al.*, 1995). C'est finalement le gène *mmaA2* qui s'est vu attribuer cette fonction de cyclopropanation distale des  $\alpha$ -mycolates dans H37Rv (Glickman, 2003). La décoration équivalente en position proximale de mycolates non oxygénés a été attribuée au gène *pcaA*. L'implication de cette décoration dans la pathogénie a été concrétisée par l'analyse d'une souche de *M.bovis* BCG mutée pour ce gène (Glickman *et al.*, 2000). En modèle murin, la souche vaccinale *M.bovis* BCG ne se multiplie pas comme le ferait une souche virulente du complexe tuberculosis, mais elle persiste malgré tout de manière relativement stable pendant plusieurs semaines. Or la souche délétée au niveau de *pcaA* n'est plus capable ni de réaliser cette cyclopropanation proximale ni de persister dans les poumons de souris après infection expérimentale en comparaison de la souche sauvage. Le mutant équivalent dans la souche de référence de *M.tuberculosis* n'est plus apte à induire expérimentalement la mort de souris quand la souche contrôle les a toutes décimées. Des résultats complémentaires publiés récemment démontrent une relation causale entre la présence de ces décorations et la pathogénicité de la mycobactérie par une régulation temporelle de la sécrétion d'une cytokine pro-inflammatoire : le TNF $\alpha$  (Rao *et al.*, 2005). En effet, la souche déficiente se multiplie moins vite dans les premiers jours suivant l'infection en modèle murin avec en parallèle l'induction d'une sécrétion décalée de TNF $\alpha$  qui aboutit en fin de course à une meilleure élimination du bacille et une plus faible propension de surface granulomateuse. Ces résultats montrent qu'une modification structurale fine d'une molécule de l'enveloppe de *M.tuberculosis* est cruciale pour sa pathogénicité en modèle animal.

Des travaux récents sur l'inactivation dans H37Rv de la méthyl-transférase *mma4* ou *cmaA*, renommée par ses auteurs *hma* pour hydroxymycolicacid, révèlent l'importance des mycolates oxygénés dans la virulence du bacille en modèle murin (Dubnau *et al.*, 2000).

La biosynthèse des cétomycolates et méthoxymycolates passerait par la formation d'un intermédiaire commun hydroxylé, qui respectivement oxydé ou méthylé permettrait d'aboutir aux métabolites finaux. Par conséquent, l'inactivation d'*hma* conduit à la disparition totale des mycolates oxygénés de l'enveloppe de la souche mutante, qui corrèle à nouveau avec une multiplication altérée de la souche déficiente dans les organes de souris immuno-compétentes infectées par aérosol. Contrairement aux décorations cyclopropane, ce phénotype d'atténuation ne proviendrait pas d'une dérégulation du processus pathologique mais de l'importance physico-chimique des groupements oxygénés dans la fluidité de la pseudo-bicouche externe. Ainsi une plus grande rigidité de la paroi serait associée à une perturbation de sa perméabilité vis à vis des nutriments, et ce, uniquement *in vivo*. La diffusion passive de substances hydrophobes est un facteur clé dans la croissance des mycobactéries dont le métabolisme anaérobie, une fois qu'elles sont phagocytées, serait basé sur le catabolisme de lipides.

**Figure 7**

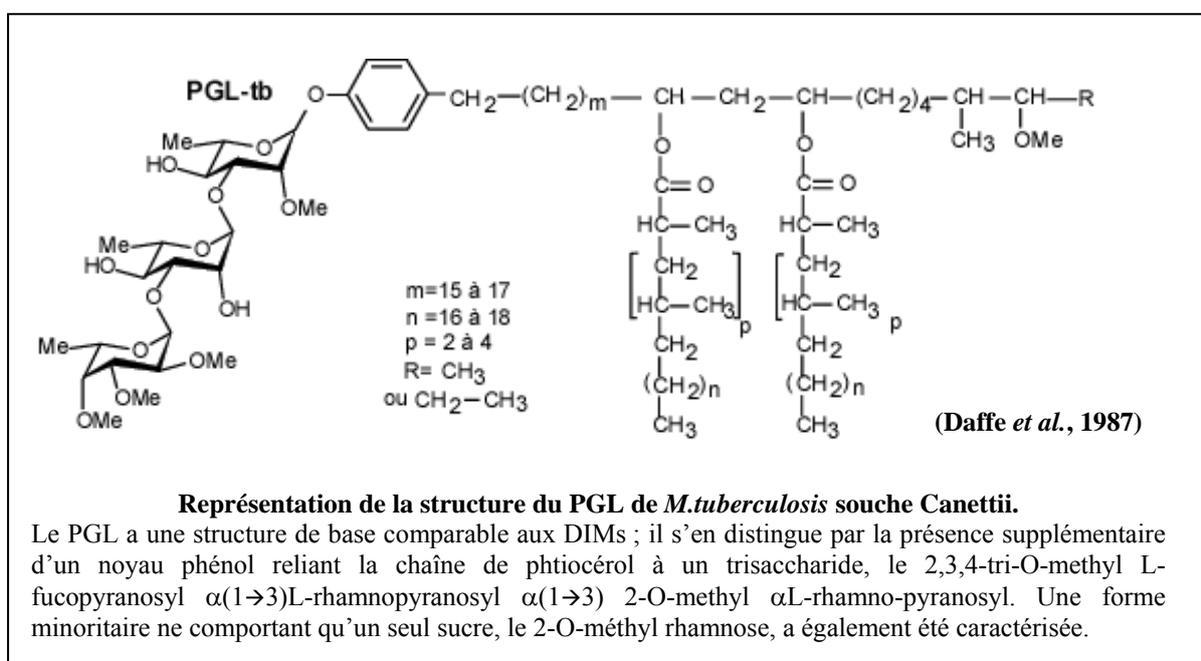


### **I.3.2.2) Les Dimycosérosates de phtiocérol (DIMs)**

Structuralement constitué d'une chaîne de phtiocérol estérifiée par deux chaînes grasses méthyl ramifiées, les acides mycosérosiques, le DIM est un lipide rencontré uniquement chez les mycobactéries pathogènes (Figure 7) (Daffé and Laneelle, 1988). Il fut associé très tôt à la pathogénicité du bacille tuberculeux, suite à la description d'une souche naturellement déficiente dont la virulence se montra atténuée chez le cobaye (Goren *et al.*, 1974a).

L'avènement d'outils génétiques appliqués aux mycobactéries amena en parallèle deux équipes indépendantes à sélectionner des souches recombinantes déficientes pour ces molécules et confirmer leur implication dans la virulence du bacille tuberculeux en modèle murin dans la souche Mt103 (Camacho *et al.*, 1999) et dans la souche Erdman (Cox *et al.*, 1999). Ces derniers dénotent une notion de tropisme à la virulence conférée par ce lipide qui favoriserait la colonisation puis la multiplication du bacille au niveau pulmonaire dans ce modèle animal. Cette notion découle du fait qu'ils réalisaient les infections par intra-veineuse et ont observé une dissémination moins marquée dans les poumons des souris infectées quand les souches ne produisaient plus de DIMs. D'autres travaux ont modéré cette notion en montrant que lors d'infection par les voies aériennes, les souches déficientes en DIMs étaient altérées non seulement pour la multiplication dans les poumons, mais également pour leur dissémination et leur multiplication dans la rate des souris infectées (Rousseau *et al.*, 2004). Par ailleurs, la perméabilité de l'enveloppe des souches déficientes pour la production de DIMs s'est révélée être nettement augmentée, ces souches devenant également plus sensibles à l'action de détergents ou de radicaux libres (Camacho *et al.*, 2001). L'accroissement de la perméabilité liée à la perte des DIMs pouvait être corrélée à une plus grande sensibilité aux mécanismes bactéricides du macrophage à l'origine de l'atténuation de la virulence des souches déficientes. Cette hypothèse fut confirmée récemment en montrant que les DIMs protégeaient *M.tuberculosis* de l'action des radicaux libres nitrogénés produits par les macrophages activés qui les avaient phagocytés (Rousseau *et al.*, 2004).

Figure 8

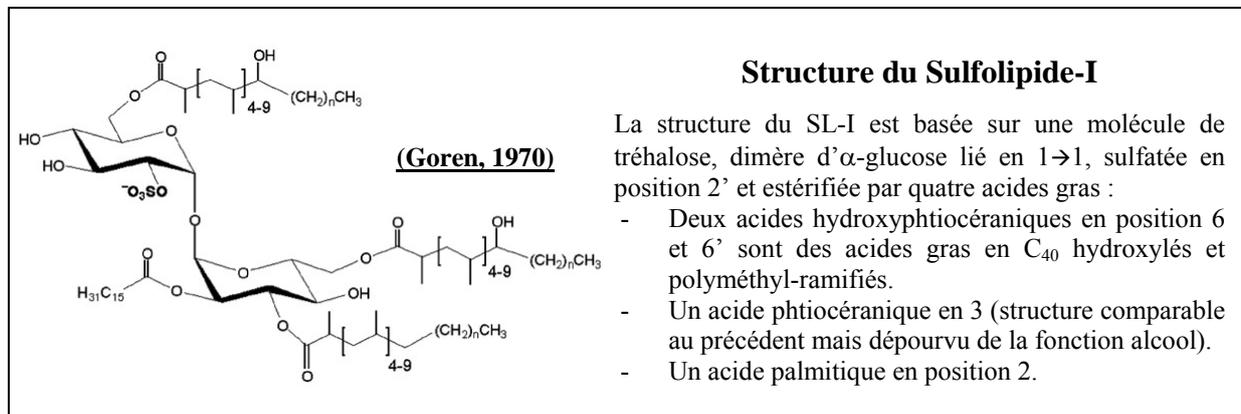


### 1.3.2.3) Les PhénoGlycolipides (PGLs)

Molécules décrites à l'origine comme présentes dans toutes les mycobactéries pathogènes, les phénoglycolipides s'assimilent structuralement aux DIMs précédemment décrits, à la différence de la présence d'un groupement phénol qui relie la chaîne de phtiocérol à un trisaccharide méthylé (Figure 8). Cette molécule a particulièrement été étudiée chez *M.leprae* de par son abondance naturelle, 2% de la masse totale de la bactérie, et suite aux nombreuses activités biologiques qui lui sont conférées : inhibition de la lymphoprolifération et de la réponse oxydative médiée par les monocytes, et son rôle dans le tropisme de *M.leprae* pour les cellules nerveuses périphériques (Pour revue, Vergne and Daffe, 1998).

Suite à l'étude biochimique de différentes souches cliniques de *M.tuberculosis*, il s'avère que la production de PGLs n'est pas une constante mais que leur présence dans les extraits lipidiques bactériens est liée à un polymorphisme génétique d'un gène de polykétide synthétase, *pks1/15* (Constant *et al.*, 2002). Cette enzyme permettrait l'initiation de l'élongation de la partie lipidique du noyau phénol, et donc d'une portion de la chaîne de phtiocérol du PGL. Ainsi, l'existence d'une mutation ponctuelle dans le gène *pks1/15* dans la souche de référence de *M.tuberculosis* H37Rv abolit la production de PGLs. C'est dans ce contexte qu'une équipe américaine s'est intéressée au rôle que pourrait jouer le PGL de *M.tuberculosis* dans sa virulence (Reed *et al.*, 2004). Ainsi ils étudièrent une souche de *M.tuberculosis*, HN878, identifiée récemment dans plusieurs foyers de recrudescence de tuberculose active aux Etats-Unis. Cette souche induit la mort de souris expérimentalement, beaucoup plus rapidement que la souche de référence H37Rv. Ils ont réalisés l'inactivation par génie génétique de *pks1/15* dans la souche HN878 pour abolir la production de PGLs. Or cette déficience métabolique s'accompagne également de la perte du phénotype d'hypervirulence observé en modèle murin, qui devient ainsi comparable à la virulence de la souche de laboratoire H37Rv qui elle, ne produit naturellement pas de PGLs. Les auteurs mettent en avant l'activité du PGL dans l'inhibition de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires sur des monocytes murins en culture, à la fois dans le contexte de la bactérie, mais également à partir de lipides purifiés. Ainsi, la production de phénoglycolipide, en influant sur la sécrétion de cytokines, serait responsable de l'induction d'une hypervirulence en modèle murin. Le lien entre cette activité du PGL et la recrudescence chez l'Homme de tuberculose active par ces souches qui les produisent reste à déterminer.

**Figure 9**



Cependant, si l'on considère le phénoglycolipide comme seul responsable du phénotype d'hypervirulence, alors la partie glucidique doit être importante, puisque la souche vaccinale *M.bovis* BCG dont le PGL n'est estérifié que par un seul sucre n'est en évidence pas très virulente. Afin d'étudier si ce phénotype d'hypervirulence ne pourrait pas être lié au contexte génétique de la souche HN878, il serait intéressant de regarder le phénotype de la souche H37Rv complétée par le chaînon manquant à la production de PGLs, *pks1/15*. Ces expériences sont en cours au laboratoire.

#### **I.3.2.4) Les lipides à tréhalose**

- Le sulfolipide I (*SL I*)

La structure du sulfolipide majoritaire de *M.tuberculosis*, le SL-I, est basée sur une molécule de tréhalose sulfatée et estérifiée par quatre chaînes grasses dont une banale saturée en C16, et trois en C40 méthyl-ramifiées, nommées acide phtiocéranique et hydroxy-phtiocéranique, puisque deux des trois sont hydroxylées (Figure 9).

La présence de sulfolipide, comme pour les DIMs, fut associée très tôt aux souches virulentes du complexe *M.tuberculosis* (Goren *et al.*, 1974b). Par la suite, des travaux lui attribuèrent une activité immuno-modulatrice sur des modèles cellulaires à partir de molécules purifiées. Ainsi le SL-I a montré sa capacité à interférer avec le relargage d'anion superoxyde par des monocytes préalablement activés artificiellement par le LPS ou l'IFN $\gamma$ . De plus, l'activité de phagocytose d'érythrocytes opsonisés par ces monocytes est également inhibée par une incubation préliminaire avec la molécule purifiée (Pabst *et al.*, 1988).

Sa localisation dans les couches les plus externes de la paroi mycobactérienne a récemment été confirmée (Converse *et al.*, 2003). Ce positionnement superficiel corrèle avec l'importance de son potentiel immunogène utilisable en sérodiagnostic (Julian *et al.*, 2002). Paradoxalement, l'obtention de souches de *M.tuberculosis* déficientes en SL-I via l'interruption d'un gène de polykétide synthase, *pks2*, ne permet pas d'établir clairement sa contribution dans la virulence dans le modèle animal considéré. En effet, une telle souche recombinante ne montre pas d'incapacité à se multiplier dans les organes des animaux infectés (Rousseau *et al.*, 2003c). Ces résultats minimisent l'importance de cette molécule

dans la virulence de *M.tuberculosis*. Ils soulèvent également le problème de l'utilisation des modèles animaux dans l'étude de facteurs de virulence concernant des pathogènes humains.

Cependant, l'étude d'un transporteur de la famille des *mmpl*, famille souvent associée fonctionnellement à des polykétides synthases, relève l'importance de cette molécule et de ses dérivés dans la pathogénèse. En effet, une souche mutée dans le gène *mmpl7*, n'est plus capable d'exporter le SL-I mature à la surface de la mycobactérie mais accumule plus en profondeur un précurseur de tréhalose sulfaté diacylé. Ce précurseur (Ac<sub>2</sub>SGL pour diacyl-sulfoglycolipide) correspondrait après révision de sa structure, au SL-I (Fig 9) dépourvu des deux molécules d'hydroxy-phthiocéranate en position 6 et 6' (Domenech *et al.*, 2004). Or cette souche est cette fois non seulement atténuée pour sa survie en modèle murin, mais également moins à même de provoquer la mort de souris infectées que la souche sauvage. L'atténuation de cette souche suppose donc sans le révéler l'existence d'un facteur supplémentaire lié à la maturation du SL-I à l'origine du phénotype d'atténuation.

De manière très intéressante, cet intermédiaire diacylé a été récemment caractérisé par une tout autre approche, comme un ligand actif d'une molécule présentatrice d'antigène de l'immunité innée le CD1b (Gilleron *et al.*, 2004). Cette protéine, à l'image des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité, s'associe à une molécule de  $\beta$ 2-microglobuline à la surface de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, pour présenter de manière originale la partie polaire d'antigènes de nature lipidique uniquement à des lymphocytes T cytotoxiques restreints par le CD1. Ce mécanisme, à la frontière entre immunité innée et immunité adaptative à médiation cellulaire, semble s'être particulièrement adapté dans l'évolution à une réponse immunitaire contre des parasites intra-cellulaires (Pour revue, Jullien *et al.*, 1997). Ces lymphocytes T restreints au CD1 montrent une sécrétion importante d'IFN $\gamma$  apte à induire l'activation du macrophage. Ils présentent également une forte activité cytotoxique vis à vis de macrophages hautement infectés, tuant par la même occasion de nombreuses bactéries et permettant la phagocytose des bacilles résiduels par de nouveaux macrophages.

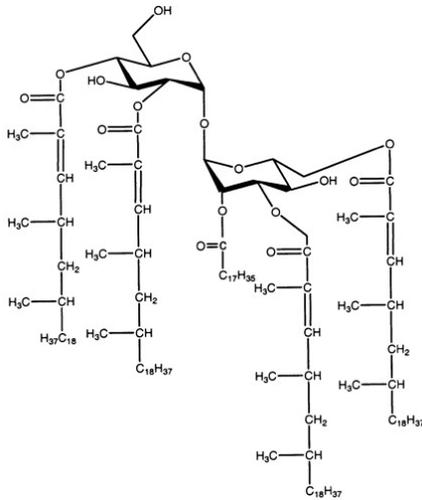
Cependant, les rongeurs ne possèdent pas de CD1 du groupe I et notamment le CD1b (Moody and Besra, 2001). Ainsi, il serait incohérent de rapprocher l'existence de ces molécules spécialisées dans la présentation du diacyl-tréhalose sulfate et une modification du tableau clinique murin liée à l'accumulation de ce produit dans la souche recombinante délétée du gène *mmpl7*. Cependant, le rapprochement souligne néanmoins le rôle potentiel de ce intermédiaire métabolique du SL-I dans l'immuno-pathologie de *M.tuberculosis*.

- Les PolyAcylTréhalose (PATs)

Le PAT est un glycolipide lui aussi structurellement basé sur une molécule de tréhalose estérifiée par cinq molécules d'acides gras variables par leur nature et leur position, regroupant des acides gras en C16:0 ou C18:0 à hauteur de 10% chacun et des acides polyméthyl ramifiés : les acides phtienoïques (mycolipanoïque (20%) et mycolipénique (60%)) (Figure 10) (Daffe *et al.*, 1988). La présence d'acide phtienoïque est restreinte à l'enveloppe des mycobactéries pathogènes du complexe *M.tuberculosis*. Curieusement, la souche vaccinale *M.bovis* BCG ne produit pas de PATs et cette différence suscita l'attention pour cette molécule en tant que facteur de virulence. La molécule purifiée engendre une inhibition de la phosphorylation oxydative mitochondriale également observée pour un autre dérivé du tréhalose d'une corynébactérie, le dicorynomycolate de tréhalose ou Cord Factor (Daffe *et al.*, 1988). C'est à nouveau la manipulation génétique d'une souche de *M.tuberculosis* qui a permis d'élucider partiellement la contribution de ce lipide dans la pathogénie mycobactérienne. En effet, l'inactivation du gène *pks3/4* dans H37Rv abolit la biosynthèse des lipides majoritairement estérifiés sur cette molécule : les acides phtienoïques. Par conséquent, la souche ne produit plus de PATs naturellement présents à la surface de la mycobactérie et participant à l'élaboration de l'asymétrie de la pseudo-membrane externe (Dubey *et al.*, 2002). La présence de ce composé est une composante essentielle des caractéristiques physico-chimiques de surface, en particulier dans l'adhésion de la capsule de la mycobactérie. En effet, le mutant déficient en PATs relargue significativement plus de matériels protéiques et glucidiques que la souche sauvage (Rousseau *et al.*, 2003a). De plus, il présente un degré d'agrégation anormale en culture. Malheureusement, ce phénotype est gênant pour l'analyse de sa virulence puisqu'il semble plus à même d'envahir de manière non spécifique des modèles cellulaires d'étude de la phagocytose. L'infection de souris par aérosol n'a pas permis de déceler une modification de la multiplication du bacille dans les organes infectés. Par contre, l'infection par intraveineuse semble favoriser l'invasion des poumons en comparaison de la souche sauvage (Rousseau *et al.*, 2003a). Il est évident que les PATs sont importants pour le maintien de l'intégrité des propriétés de surface de *M.tuberculosis*. Leur participation dans la pathogénie de *M.tuberculosis* est moins claire.

**Figure 10**

**Structure des PolyAcylTréhalose de *M.tuberculosis* souche Canettii.**

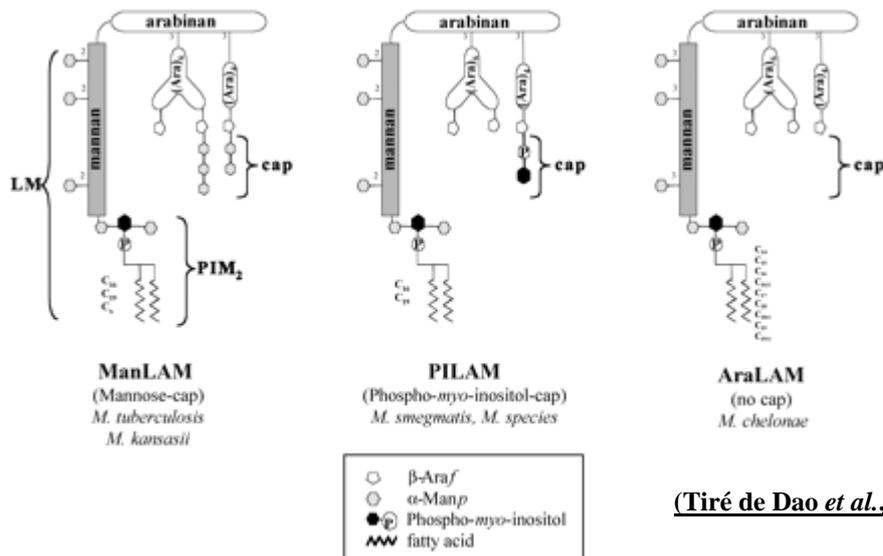


Les Polyacyltréhalose, ou PATs, sont constitués d'une molécule de tréhalose estérifiée en position 2,2',3',4 et 6' par cinq acides gras. Les substituants majoritaires sont les acides phtienoïques. Ce sont des acides gras dextrogyres en C<sub>27</sub> méthylés en position 2, 4 et 6. Ils regroupent deux espèces majoritaires, les acides mycolipéniques insaturés en position 2 et les acides mycolipanoliques saturés et hydroxylés en position 3. La proportion des substituants est de 10% pour l'acide palmitique, 10% pour l'acide stéarique, 20% d'acides myco-lipanolique et 60% d'acides mycolipéniques

(Daffe *et al.*, 1988)

**Figure 11**

**Représentation des différents glycolipides mannosylés mycobactériens**



(Tiré de Dao *et al.*, 2004)

La présence de PIMs, LMs et LAMs a pu être caractérisée dans toutes les mycobactéries étudiées. Leur structure est globalement conservée dans les différentes espèces excepté concernant la nature des résidus branchés à l'extrémité des ramifications arabinane du LAM. Ainsi, la présence de coiffes ou « cap » mannose est décrite uniquement chez *M.tuberculosis* et la souche pathogène opportuniste *M.kansassi*. Les autres espèces sont coiffées de résidus phosphatidyl-*myo*-inositol. Seul *M.chelonae* ne possède pas de LAM coiffé.

### I.3.2.5 Les glycolipides mannosylés (PIMs/LM/LAM)

Les glycolipides mannosylés mycobactériens ont en commun une ancre lipidique représentée par une molécule de glycosyl-phosphatidyl-inositol et diffèrent par le degré et la complexité des motifs saccharidiques qui les caractérisent. Ainsi le nombre de résidus mannose reliés en 6 de l'inositol permet de distinguer plusieurs molécules de glycosyl-phosphatidyl-inositol mannoside dérivées successivement les unes des autres. Ainsi, le nombre de résidus mannosylés (Man<sub>p</sub>) relié en  $\alpha(1\rightarrow6)$  est mis en indice pour désigner les PIM<sub>2</sub>, PIM<sub>4</sub> et PIM<sub>6</sub>. Le LipoManne ou LM résulte d'une chaîne de douze résidus Man<sub>p</sub> comportant trois ramifications d'un unique résidu Man<sub>p</sub> en  $\alpha(1\rightarrow2)$ . Bien que ce mécanisme ne soit pas encore élucidé, l'ajout d'un domaine arabinane, polymère de résidus arabinofuranosyl (Araf) lié en  $\alpha(1\rightarrow5)$ , serait dépendant de l'activité de la protéine *EmbC* (Zhang *et al.*, 2003). Cela rend la voie métabolique du LipoArabinoManne (LAM) distincte de celle du motif arabinane de l'arabinogalactanne, précédemment décrite comme cible de l'EMB, et qui elle ferait intervenir *EmbA* et *EmbB*. Des ramifications monoantennaires de 4 unités Araf et biantennaires de 6 unités Araf se terminent dans tous les cas par une extrémité non-réductrice représentée par un résidu Araf lié en  $\beta(1\rightarrow2)$ . Jusque là, cette description convient au LAM de toutes les espèces mycobactériennes, seules quelques subtilités venant différencier ces molécules. En effet, on décrit la présence de coiffes osidiques à l'extrémité de ces antennes d'arabinose qui, selon s'il s'agit de mannose ou de phospho-*myo*-inositol, seront nommés Man-LAM et Pi-LAM respectivement. L'absence de coiffe, uniquement décrite chez *M.chelonae* est à l'origine de l'Ara-LAM (Figure 11).

Le Man-LAM est caractéristique des mycobactéries pathogènes à croissance lente. Une revue fait la corrélation entre la présence de Man-LAM et une immuno-régulation du macrophage favorable à la survie des mycobactéries après phagocytose (Briken *et al.*, 2004). En effet, le Pi-LAM de *M.smegmatis*, contrairement au Man-LAM du complexe *M.tuberculosis*, induit une forte sécrétion de TNF $\alpha$ , cytokine pro-inflammatoire. De plus, le Man-LAM de *M.tuberculosis* est capable d'inhiber la sécrétion de TNF $\alpha$  induite classiquement par le LPS et médiée par un récepteur de l'immunité innée, le TLR4. L'inhibition de cette signalisation passant par la voie NF- $\kappa$ B ferait intervenir, par des mécanismes encore indéterminés, la reconnaissance du LAM par le récepteur au mannose (Revue dans Nigou *et al.*, 2002). Cette inhibition conduit également à une diminution de la sécrétion d'IL<sub>12</sub> dont l'importance a été démontrée par une susceptibilité mendélienne associée

à son récepteur chez certains individus spécialement sujets aux infections mycobactériennes (Doffinger *et al.*, 2000).

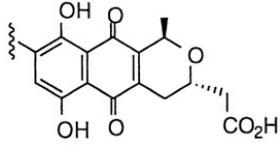
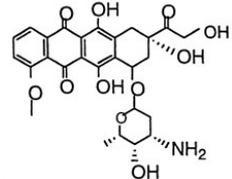
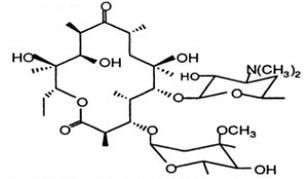
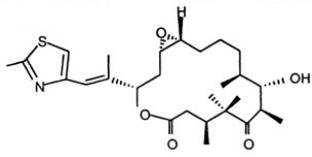
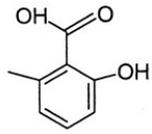
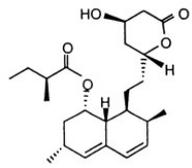
Récemment, les PIMs se sont révélés être de bons candidats antigéniques de lymphocyte T restreints au CD1d (Fischer *et al.*, 2004). Ils constituent également avec l'Ara-LAM des agonistes du TLR2, récepteur impliqué dans la signalisation de l'apoptose du macrophage mais également dans la régulation de l'expression du CMH de type II (Heldwein and Fenton, 2002). Dans le même sens, le Pi-LAM et le LM sont capables d'induire l'apoptose de macrophages humains différenciés expérimentalement, et la production d'IL12 par des macrophages murins. L'activité du LM a ensuite été reliée au TLR2 suite à la transcription d'un gène rapporteur membranaire (CD25) dans des lignées cellulaires transfectées par le gène codant ce récepteur (Dao *et al.*, 2004). Les auteurs avancent l'importance d'une régulation par la mycobactérie de la biosynthèse du LAM dans l'établissement d'une balance LAM/LM favorable à la bactérie aux différents stades de l'infection.

Enfin, le ManLAM de tuberculosis serait également le ligand principal d'un récepteur lectinique, le DC-SIGN, présent à la surface de cellules présentatrices d'antigènes spécialisées, les cellules dendritiques. Ces cellules ont la particularité de migrer du site infectieux vers les organes lymphoïdes secondaires pour y activer les populations de lymphocyte T réactives. Cette voie d'entrée constituerait un réservoir qui permettrait d'expliquer certaines atteintes liées aux infections mycobactériennes comme les adénites (infection d'un ganglion lymphatique) (Tailleux *et al.*, 2003).

Pour conclure, ces glycolipides mannosylés font l'objet de nombreuses études concluantes vis à vis de leurs activités immuno-régulatrice des infections mycobactériennes. Cependant, aucune souche déficiente de *M.tuberculosis* n'a pu être obtenue à ce jour. L'extension des résultats vis à vis d'*EmbC* de *M.smegmatis* dans une souche pathogène devrait en y remédiant permettre de confirmer ou non ces résultats sur des modèles animaux et dans le contexte génétique de la bactérie.

A l'exception de cette dernière classe de glycolipides mannosylés, tous ces lipides complexes et impliqués dans la pathogénicité de *M.tuberculosis* ont été révélés peu avant, pendant, et suite à l'établissement de ce travail, comme des produits de polykétide synthase. De plus, la recherche de mutants de *M.tuberculosis* atténués pour la multiplication en modèle murin après inactivation aléatoire de ces gènes par transposition d'éléments génétiques mobiles a, dans deux études indépendantes, souligné l'importance de gènes de polykétides synthases dans la virulence de la souche de départ (Camacho *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 1999). Parallèlement, l'annotation du génome d'H37Rv laisse apparaître 24 gènes de polykétides synthases. Il devient donc nécessaire de distinguer métaboliquement un polykétide d'un lipide classique avant de décrire plus amplement la nature de ces polykétides mycobactériens importants pour la structuration de l'enveloppe, et impliqués dans la pathogénie du bacille tuberculeux.

**Tableau 3**

| Type enzymatique                                    | Dérivé de polykétide<br>(Organisme d'origine)                        | Formule  | Activité<br>(Référence)  |
|---|--|--|--|
| Polykétide<br>synthase<br>bactérienne<br>de type II | <b>Actinorhodine</b><br><i>(Streptomyces coelicolor)</i>             |    | <b>Antibiotique</b><br><i>(Fernandez-Moreno et al., 1994)</i>                              |
|   | <b>Doxorubicine</b><br><i>(Streptomyces peucetius)</i>               |    | <b>Anticancéreux</b><br><i>(Otten et al., 1990)</i>  |
| Polykétide<br>synthase<br>bactérienne<br>de type I  | <b>6-déoxyérythronolide B</b><br><i>(Saccharopolyspora erythrae)</i> |    | <b>Antibiotique</b><br><i>(Cortes et al., 1990)</i>  |
|   | <b>Epothilone A</b><br><i>(Sorangium cellulosum)</i>                 |  | <b>Anticancéreux</b><br><i>(Tang et al., 2000)</i>   |
| Polykétide<br>synthase<br>fongique<br>de type I     | <b>Acide 6-méthyl salicilique</b><br><i>(Penicillium patulum)</i>    |  | <b>Précurseur<br/>d'antibiotique</b><br><i>(Beck et al., 1990)</i>                         |
|   | <b>Lovastatine</b><br><i>(Aspergillus terreus)</i>                   |  | <b>Traitement de<br/>l'hyper-<br/>Cholestérolémie</b><br><i>(Hendrickson et al., 1999)</i> |

Quelques exemples de polykétides possédant une activité pharmacologique, isolés de streptomycètes ou de champignons. Noter la diversité structurale et les variétés d'applications pharmacologiques des polykétides.

## I.4) Les polykétides synthases

### I.4.1) Généralités et données bibliographiques

Les polykétides synthases sont responsables de la biosynthèse de produits naturels variés importants en pharmacologie. En effet, les molécules produites, nommées polykétides, sont des molécules complexes et souvent biologiquement actives en tant qu'antibiotiques, antifongiques ou anticancéreux. Quelques exemples sont illustrés dans le tableau 3. Ce sont des molécules restreintes dans le monde du vivant à certaines espèces de bactéries, plantes et champignons filamenteux, mais deux tiers des molécules actives ont été isolées à partir d'actinomycètes (Pfeifer and Khosla, 2001). A l'origine, ce sont des métabolites secondaires qui, par définition, ne sont pas essentiels pour la croissance, le développement ou la reproduction de l'organisme qui le produit. Leur fonction biologique dans le cycle vital de ces micro-organismes reste obscure, mais elle pourrait intervenir comme facteur sélectif de survie en cas de carence nutritive. En dépit d'une grande diversité structurale, les polykétides synthases synthétisent les polykétides via un mécanisme enzymatique commun. Ces enzymes, comme leur nom le suggère, catalysent la condensation de précurseurs acétates ou propionates, aboutissant à la formation de  $\beta$ -céto-ester (« kétide »). Le processus enzymatique est très similaire aux systèmes bactériens ou eucaryotes de biosynthèse des acides gras : les systèmes FAS. La biosynthèse des acides gras comme des polykétides, nécessite l'association de plusieurs domaines enzymatiques. Les domaines minimum requis pour la biosynthèse d'un polykétide constituent le module « cœur » d'élongation et sont au nombre de trois par module : (1) un domaine acyl-transférase (AT), (2) un domaine kétosynthase (KS), (3) le domaine porteur ou acyl-carrier-protein (ACP). Le domaine porteur nécessite une modification post-traductionnelle qui permet de distinguer l'apo-enzyme de sa forme active l'holo-enzyme (Figure 12) (Walsh *et al.*, 1997).

Le domaine AT charge l'unité d'élongation activée par carboxylation, au niveau du bras du domaine ACP. Puis le domaine KS réalise la condensation entre l'unité à allonger, reliée via une liaison thioester à une cystéine du domaine, et l'unité d'élongation qui subit alors une décarboxylation oxydative (Figure 13).

Figure 12

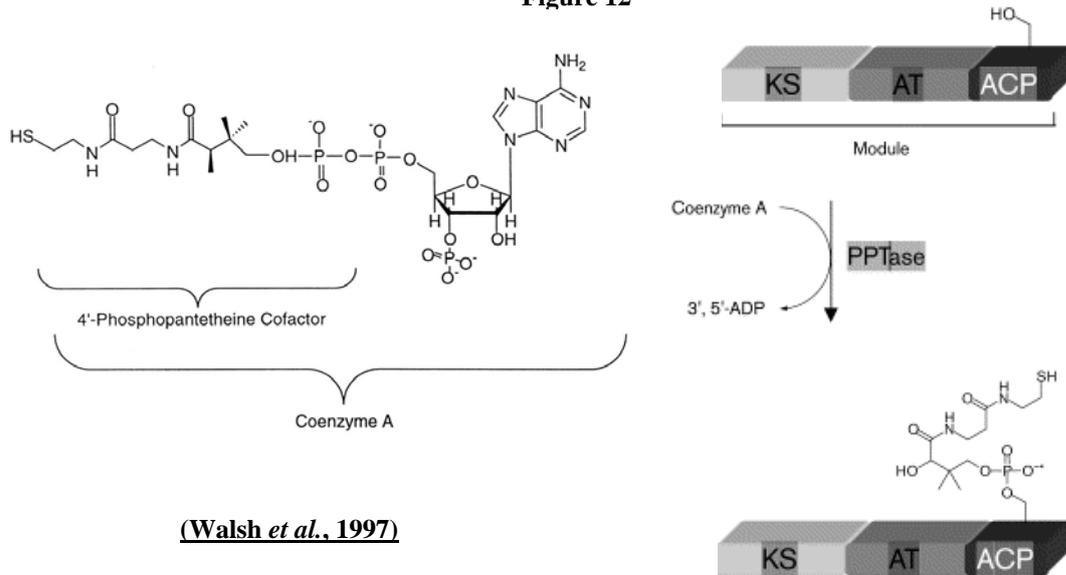
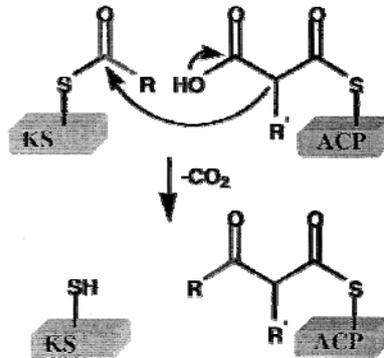


Illustration de la modification post-traductionnelle du domaine ACP des polykétides synthases par une PhosphoPantéthéinylTransférerase ou PPTase. Cette modification repose sur le transfert d'un groupement phosphopantéthéinyl provenant du co-enzyme A par formation d'une liaison phosphodiester avec un résidu sérine du domaine ACP de l'apoenzyme.

Figure 13

Représentation schématique de la réaction minimale catalysée par le module cœur d'une polykétide synthase. Le kétide ou  $\beta$  cétoester est issu de la condensation de la molécule à allonger, fixé par liaison thioester à une cystéine du domaine kétosynthase (KS), avec une molécule élongatrice, portée par le groupement prosthétique du domaine porteur ou Acyl Carrier Protein (ACP)



(Pfeifer and Khosla, 2001)

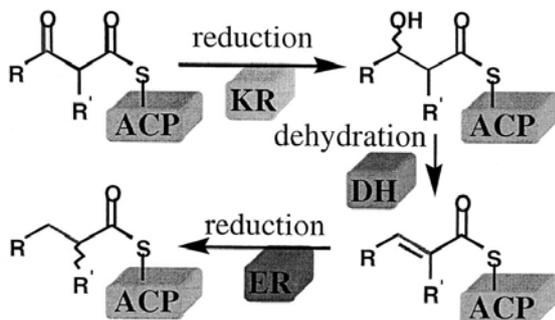


Figure 14 Schéma réactionnel des modifications optionnelles du  $\beta$ cétoester formé par le module cœur des polykétides synthases et porté par le domaine ACP. En présence d'un domaine kétoréductase (KR), la fonction cétone en  $\beta$  sera réduite. Le domaine déshydratase (DH) pourra provoquer l'apparition d'une insaturation avec libération concomittente d'une molécule d'eau. Enfin, l'insaturation pourra être réduite suite à l'activité d'un domaine énoyl-réductase (ER)

(Pfeifer and Khosla, 2001)

Le kétide généré par l'activité du domaine KS est un  $\beta$ -cetoester qui peut, dans certains cas, devenir le substrat de domaines optionnels (Figure 14). Ainsi la présence d'un domaine kéto-réductase (KR) supplémentaire dans le module de la polykétide synthase considérée pourra permettre la réduction de la fonction cétone en bêta puis, si un domaine déshydratase (DH) est présent, induire l'apparition d'une insaturation accompagnée de la libération d'une molécule d'eau. Enfin, l'insaturation pourra être réduite suite à l'action d'un domaine énoyl-reductase (ER) aboutissant à une chaîne carbonée saturée. Durant toutes ces transformations, le  $\beta$  ceto-ester initialement formé reste relié par son groupement prosthétique au domaine ACP du module.

Ce qui diffère du mécanisme réactionnel décrit dans le métabolisme lipidique réside dans le fait que justement certains domaines sont optionnels. En effet, les systèmes de biosynthèse d'acides gras des vertébrés (FAS I) réunissent tous les domaines précédemment décrits sur un même polypeptide et fonctionnent de manière itérative. Une fois le substrat transformé par chaque domaine, le produit final redevient le substrat du premier domaine. Le fonctionnement itératif dans les systèmes FAS se résume donc à un mécanisme cyclique qui allonge le substrat initial par unités de deux atomes carbonés jusqu'à l'obtention d'un acide gras banal saturé. Si des modifications de type insaturation sont nécessaires, ce sont des enzymes annexes, en l'occurrence une désaturase, qui viendront modifier ultérieurement le produit final comme décrit précédemment pour l'introduction des décorations dans la chaîne méromycolique. A la différence, un module de polykétide synthase ne possède pas forcément les domaines optionnels, KR, DH et ER. Ainsi, un antibiotique de la famille des anthracyclines illustre parfaitement cette particularité suite à la biosynthèse par le complexe multi-enzymatique isolé chez *Streptomyces glaucescens* de la tétracénomycine (Figure 15) (Hutchinson, 1997). Ce complexe est composé de cinq polypeptides correspondant respectivement à, une malonyl-coA : ACP acyltransférase pour MAT, d'un domaine KS dimérique, TCM<sub>KL</sub>, et du domaine ACP, TCM<sub>M</sub>. Bien que nécessaire, la fonction de TCM<sub>L</sub> n'a pas été élucidée. Le fonctionnement itératif de ce complexe permet la formation d'une molécule polycétonique qui suite à l'action d'une cyclase TCM<sub>N</sub> aboutit à la molécule active.

Un degré de complexité apparaît suite à la distinction des différentes classes de polykétides synthases. Les polykétides synthases sont classées en deux catégories selon que l'architecture de leur structure primaire soit homologue au système FAS de vertébrés (type I FAS) ou à celui des bactéries et des plantes (type II FAS) (Hopwood and Sherman, 1990).

Figure 15

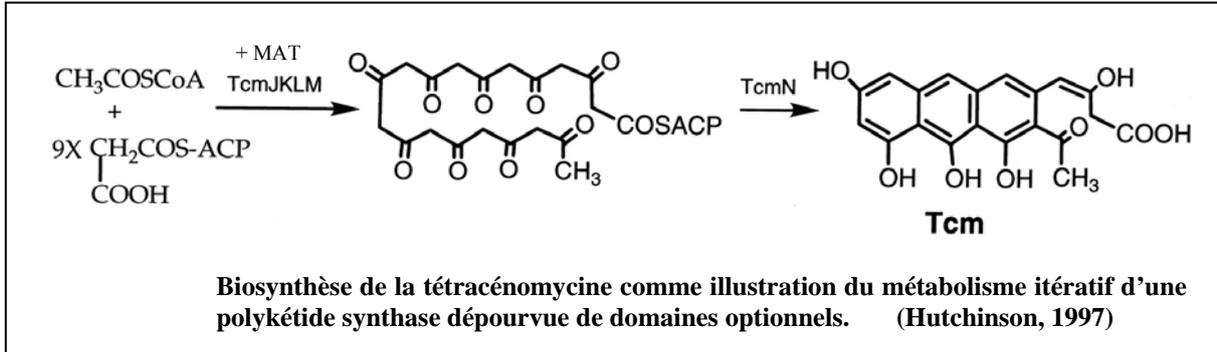
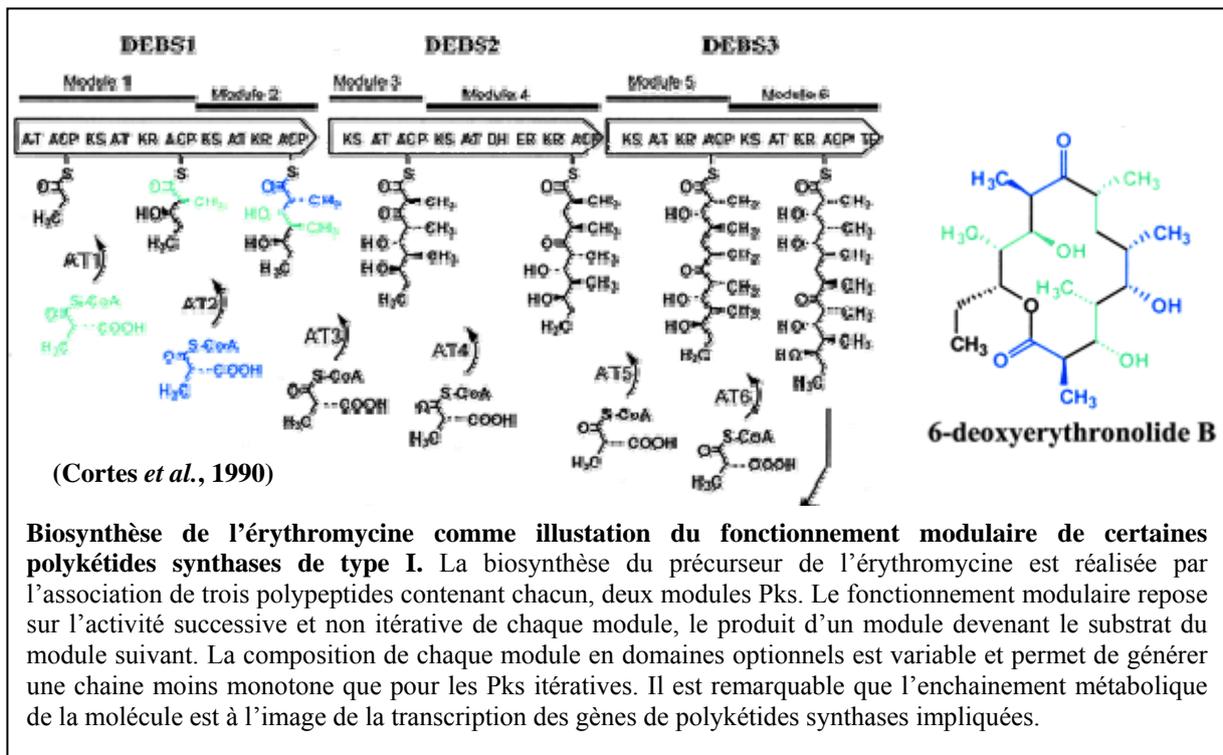


Figure 16



Ainsi, les Pks de type I comme les systèmes FAS des vertébrés regroupent les différents domaines constitutifs d'un module sur une seule séquence polypeptidique. En comparaison, les Pks de type II résultent de l'association fonctionnelle de plusieurs polypeptides portant chacun un domaine catalytique. Les chalcone synthase (CHS), ubiquitaires chez les plantes pour la production de flavonoïdes, constituent un troisième type de Pks. Comme les Pks de type II, ce sont des enzymes monofonctionnelles dont le mécanisme réactionnel diffère notamment par l'utilisation directe du substrat activé par le co-enzyme A sans nécessité de transfert préalable sur un domaine porteur, cette famille ne nécessite donc pas d'activation par les PPTase. A l'image des systèmes FAS, les Pks de type II, comme les CHS, sont itératives. En revanche, les Pks de type I sont soit itératives, soit modulaires. Dans le deuxième cas, chaque cycle d'élongation est réalisé par un module différent. Ainsi les Pks de type I peuvent regrouper sur un même polypeptide plusieurs modules d'élongation et constituer par conséquent des protéines de très haut poids moléculaire. Par exemple, la première des trois polykétides synthases à l'origine de la biosynthèse de la toxine de *M.ulcerans* contient huit modules et atteint 1800kDa (Stinear *et al.*, 2004). En pratique, l'activité modulaire est en quelque sorte une application d'avant-garde du taylorisme : le produit du premier module devient le substrat du deuxième et ainsi de suite, jusqu'au dernier module qui est le seul à posséder le domaine thioestérase TE nécessaire pour libérer le polykétide produit. L'exemple le plus frappant, bien décrit dans la littérature, repose sur la biosynthèse par *Saccharopolyspora erythrae* d'un antibiotique de la famille des macrolides : l'érythromycine (Figure 16). Cette molécule cyclique est le produit de trois polykétides synthases de type I et nommées DEBS1, 2 et 3 (**D**eoxy**E**rythronolide**B** Synthase). Chacune des Pks contient deux modules d'élongation de composition variable en terme de domaines. DEBS1 contient en plus de deux modules d'élongation, un domaine de charge ou « loading domain » (AT+ACP), qui permet le chargement du substrat de départ, ici le malonyl-coA.

L'activité modulaire des Pks de type I s'oppose à la monotonie fonctionnelle des systèmes FAS pourtant basés sur le même mécanisme réactionnel. Le terme de programmation est employé pour désigner la multitude des choix attribués à chacun des modules pour aboutir aux subtilités structurales des polykétides. Dans l'exemple choisi, un premier choix programmé est réalisé par la spécificité variable du substrat pris en charge par le domaine acyl-transférase des Pks, en comparaison des systèmes FAS. En effet, on peut noter que la spécificité du domaine AT du loading domain de DEBS1 pour le malonyl-coA est différente

de celles des autres modules pour le méthyl-malonyl-coA. Ceci permet l'introduction d'une fonction méthyl sur chacun des  $\beta$ céto-esters formés.

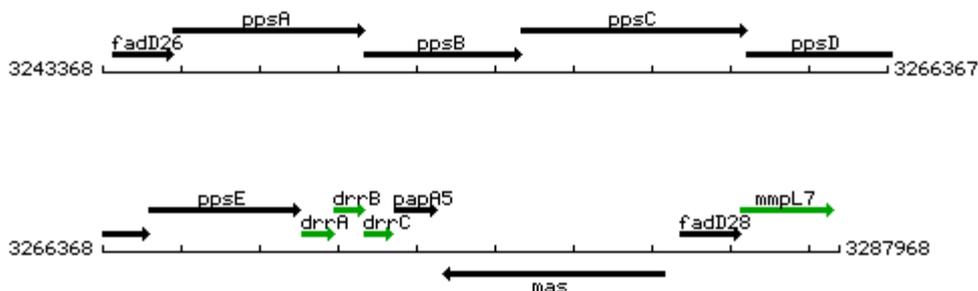
Le deuxième degré de programmation réside dans la nature variable de la composition de chaque DEBS en domaines optionnels. Ainsi l'absence de domaine supplémentaire sur le premier module de DEBS2 permet de conserver le carbonyle issu de la condensation de la troisième molécule de méthyl-malonyl, contrairement aux deux modules de DEBS1 qui les avaient réduits. A l'inverse, le quatrième module porté par DEBS2 contient tous les domaines supplémentaires décrits précédemment, ce qui aboutit à la saturation locale de la chaîne en élongation. Après action des cinquième et sixième modules de DEBS3, le produit pourrait ressembler à une chaîne grasse hydroxylée et méthyl ramifiée aléatoirement. La libération par le domaine thioestérase (TE) du sixième module conduira après cyclisation à la molécule active. Le fonctionnement modulaire permet donc la formation de molécules moins monotones que les systèmes itératifs. De plus, les polykétides sont souvent assujetti à des modifications ultérieures (cyclisation, méthylation, glycosylation), par des enzymes d'ailleurs généralement juxtaposées génétiquement au locus de la Pks en question.

Parallèlement, il est remarquable que l'enchaînement fonctionnel des modules DEBS soit à l'image exacte de l'enchaînement génomique des gènes qui les codent, d'ailleurs transcrit en opéron (Cortes *et al.*, 1990). Cette caractéristique des loci de Pks de type I bactérienne peut permettre d'envisager la structure d'un polykétide, simplement par l'analyse génétique du locus Pks qui le synthétise. Cette organisation fonctionnelle a ouvert un large champ d'investigation sur les traces de la chimie combinatoire via la production de nouvelles molécules par génétique combinatoire, en tentant de remplacer ou d'introduire un domaine, jusqu'à modifier leur spécificité par des mutations ponctuelles (Pour revue, Kealey, 2003). Un des avantages notables dans cette approche repose sur la sélectivité enzymatique des énantiomères métabolisés que la chimie combinatoire peut difficilement distinguer. Des outils bioinformatiques pour la prédiction de l'organisation des domaines Pks et de leur spécificité de substrat ont récemment été mis à disposition suite à l'élaboration d'une banque de données spécifique des Pks (PKSDB) (Yadav *et al.*, 2003).

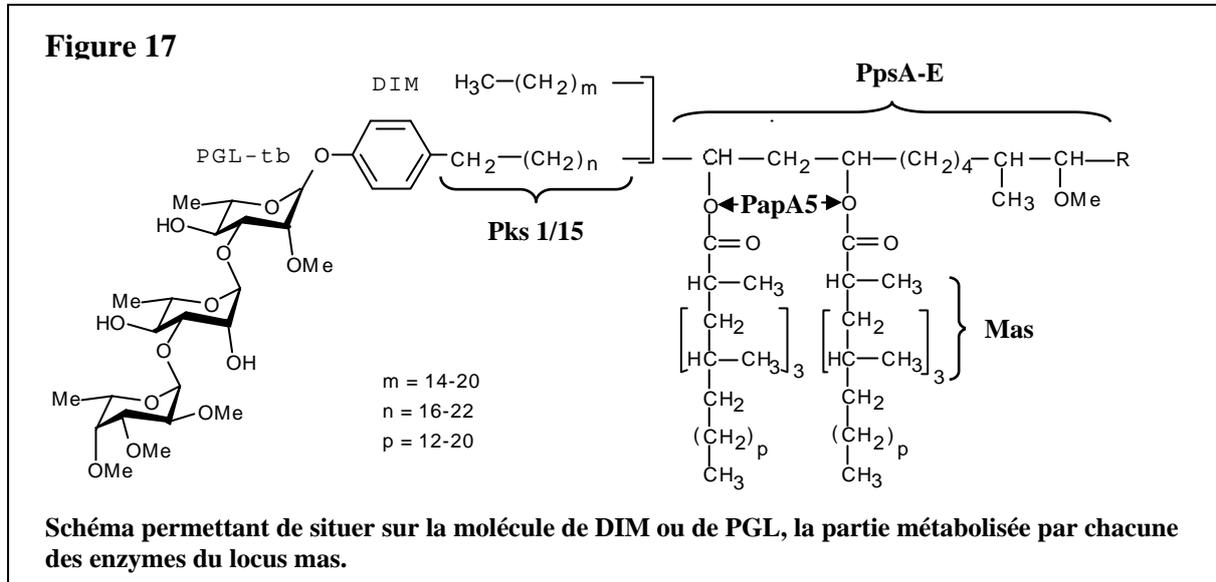
#### I.4.2) Les polykétides synthases de *M.tuberculosis* H37Rv

- **Le locus *mas***

Avant le décryptage et l'annotation du génome d'H37Rv, une équipe américaine isola biochimiquement puis génétiquement l'enzyme responsable de la biosynthèse des acides mycosérosiques chez *M.bovis* BCG : la mycosérosate acide synthase ou Mas (Mathur and Kolattukudy, 1992; Rainwater and Kolattukudy, 1985). Cette Pks de type I est itérative, elle permet, en utilisant du méthyl-malonyl co-A, l'introduction des groupements méthyl sur les carbones 3, 5, 7 et 9 des acides mycosérosiques, par élongation d'un acide gras classique (Figure 17). Ce fut la première polykétide synthase isolée d'une souche du complexe *M.tuberculosis* et déjà elle se montra impliquée dans le métabolisme d'un lipide majeur propre aux mycobactéries pathogènes. Ces résultats furent confirmés par la perte des dimycosérosates de phtiocérol (DIMs) suite à l'inactivation spécifique du gène *mas* chez *M.bovis* BCG (Azad *et al.*, 1996). Finalement, les DIMs et PGLs se sont révélés constituer l'archétype du polykétide mycobactérien en nécessitant l'activité successive de sept Pks distinctes. Tout d'abord, c'est le locus responsable de la biosynthèse de la chaîne de phtiocérol qui fut caractérisé. Il comprend 5 Pks de type I à fonctionnement modulaire appelé Pps pour **P**htiocérol/**P**hénol**p**htiocérol **S**ynthase et annoté *ppsA*, *B*, *C*, *D* et *E* (Figure 17) (Azad *et al.*, 1997). Plus récemment, l'importance d'une septième Pks est venue élucider la biosynthèse du PGL qui se distingue des DIMs par la présence supplémentaire d'un groupement phénol sur la chaîne de phtiocérol. C'est la Pks 1/15 qui prendrait l'acide parahydroxy-benzoïque pour initier son élongation et fournir le produit résultant comme substrat pour PpsA (Figure 17). Le séquençage d'H37Rv indique une co-localisation de tous les gènes impliqués dans cette voie de biosynthèse sur le chromosome de *M.tuberculosis*.

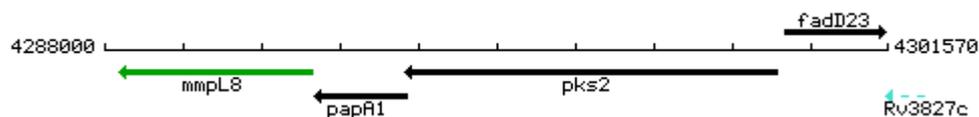


Les autres gènes présents sur ce locus ont également été impliqués dans la biosynthèse des DIMs. Les FadD26 et 28 permettent l'activation sous forme d'acyl-AMP du substrat de la polykétide adjacente (Trivedi *et al.*, 2004). Les Drr et la Mmpl7 participeraient au transport des DIM vers l'enveloppe (Camacho *et al.*, 2001) et PapA5 à l'estérification des mycosérosates sur la chaîne de phthiocérol (Trivedi *et al.*, 2005).

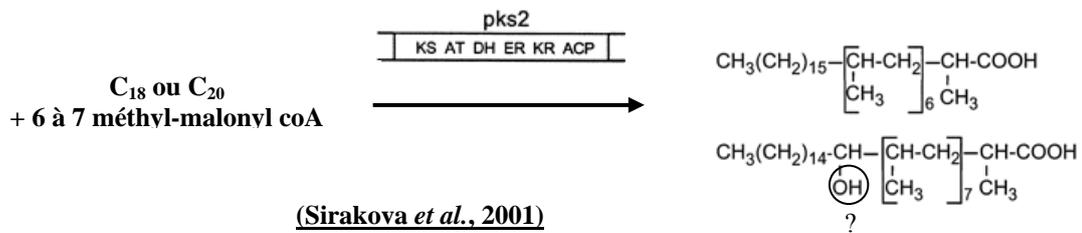


- **Le locus *pks 2***

De manière comparable au locus DIM, Pks2 est génétiquement associée à, (i) une acyl-AMP ligase (FadD23), (ii) une protéine conservée associée aux polykétides synthases (PapA1), (iii) un transporteur membranaire (Mmpl8). L'organisation des domaines présents est comparable à la protéine Mas, c'est pourquoi elle est aussi nommée Msl2 pour « Mass-like 2 » (Sirakova *et al.*, 2001).



L'inactivation du gène *pks2* dans H37Rv a permis de caractériser fonctionnellement cette enzyme comme impliquée dans la biosynthèse des acides phthiocéraniques et hydroxy-phthiocéraniques (Sirakova *et al.*, 2001). Ces acides gras polyméthyl-ramifiés sont retrouvés principalement estérifiés sur le tréhalose sulfate.



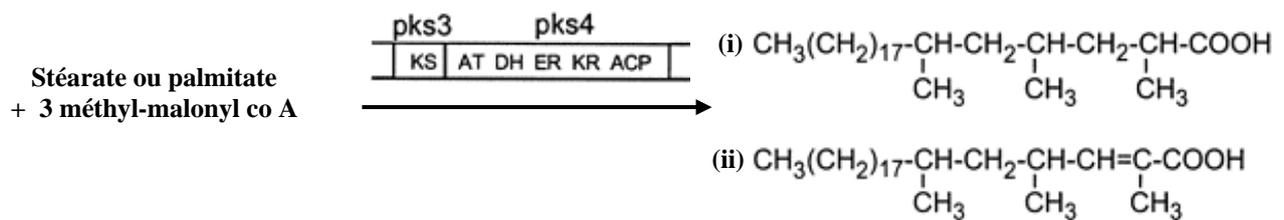
Comme Mas, Pks2 est une Pks de type I itérative. La présence des domaines DH, ER et KR est en accord avec la structure décrite pour les acides phtiocéraniques suite à la condensation d'unités méthyl-malonyl. En revanche, l'existence d'un groupement hydroxyl sur l'hydroxy-phtiocéranate n'est pas en accord avec le domaine DH présent sur Pks2. Deux hypothèses sont envisageables. (1) L'enzyme est capable d'utiliser indifféremment un substrat hydroxylé ou non. Dans ce cas, il existe une autre Pks dépourvue de domaine optionnel DH et ER qui condenserait une première unité de malonyl-coA, réduirait la cétone et fournirait la molécule à Pks2 qui réaliserait les 6 cycles de condensation suivante avec du méthyl-malonyl co-A. (2) Pks2 est bien responsable de la biosynthèse des deux molécules et pour une raison indéterminée, elle effectuerait un dérapage fonctionnel lors du premier cycle d'élongation en condensant par erreur la première unité de malonyl co-A à la place du méthyl-malonyl co-A.

- **Le locus *pks 3/4***

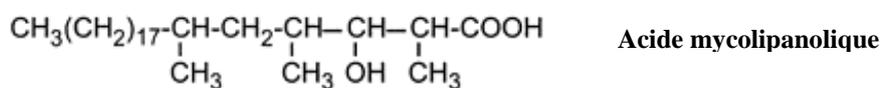


Cette polykétide synthétase, de par la nature et l'organisation de ses domaines et sa spécificité prédite pour l'utilisation du méthylmalonyl-coA, est également une « Mas-like », retrouvée sous le nom de Msl 3. Il est remarquable que la nature et l'organisation des gènes présents autour de certains loci *pks* soient redondantes. En effet, on retrouve à nouveau une protéine PapA, un transporteur de la famille des Mmpl, et une acyl-AMP ligase, FadD. Pks3/4 présente la particularité d'une séparation génétique du domaine KS portés par la Pks 3 et des domaines AT, DH, ER, KR et ACP porté par la Pks 4. Il apparaît en fait que cette séparation ne soit pas constante au sein des différents isolats de *M.tuberculosis* mais plutôt une

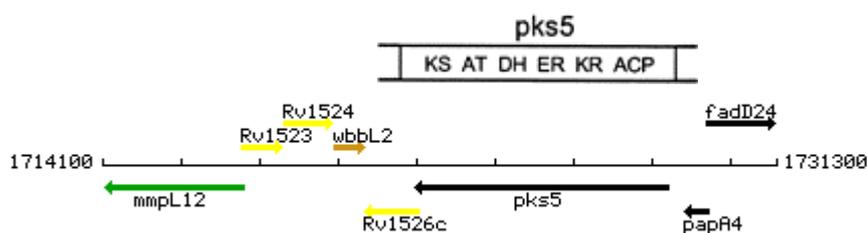
particularité de la souche séquencée d'H37Rv. En effet, le décryptage d'un fragment peptidique d'une protéine de 225kDa de l'ATCC 25618 par une équipe américaine a montré que ce peptide chevauchait les deux cadres de lecture des Pks 3 et 4, montrant que dans la souche étudiée, les deux protéines prédites ne faisaient qu'une (Dubey *et al.*, 2002). Cette même équipe a réalisé l'inactivation génique de Pks3/4 et a montré la perte pour la souche recombinante de la production d'acides phtiénoïques, précédemment décrits comme étant le groupement majoritairement acylé sur le tréhalose des PATs apolaires (§ 1.3.2.4).



On notera à nouveau que les acides phtiénoïques regroupent deux molécules distinctes, (i) les acides mycolipanoïques et (ii) les acides mycolipéniques, qui se distinguent par la présence d'une insaturation. La biosynthèse de ces deux molécules étant liée à la présence d'une seule Pks, il semble plus raisonnable d'envisager dans ce cas l'hypothèse du dérapage car il semble difficile d'imaginer que le troisième cycle soit réalisé si aléatoirement pour laisser place à une autre Pks. Il est également notable que contre toute attente, la biosynthèse d'un lipide structuralement très proche n'est pas affecté par l'inactivation de *pks 3/4*. Cet acide gras nommé acide mycolipanolique, possède également trois fonctions méthyl et une fonction hydroxyle laissées vraisemblablement au troisième cycle de condensation par une Pks non identifiée à ce jour.

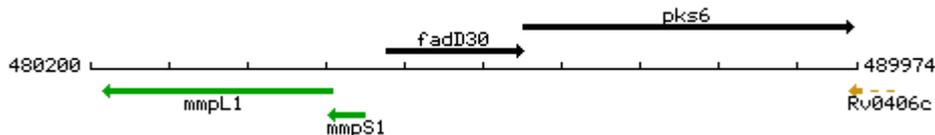


- **Le locus *pks 5***



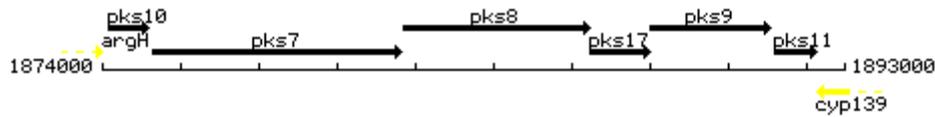
Faisant également partie des « Mas-like » caractérisées par Sirakova et al en 2001, l'organisation de ce cluster laisse prédire son implication dans la biosynthèse d'un glycolipide de l'enveloppe. En effet, la présence de trois glycosyl-transférases putatives entre le gène codant Pks5 et le transporteur Mmp12 qui lui semble fonctionnellement associé fournirait les enzymes nécessaires à son métabolisme. Une méta-analyse informatique portant sur la comparaison des séquences connues de polykétide synthase et dont la fonction est élucidée a permis aux auteurs de prédire, via la nature d'un résidu conservé du site actif de domaines AT, la spécificité du module d'élongation pour le malonyl ou le méthyl-malonyl (Yadav *et al.*, 2003). Ces auteurs ont montré la véracité de leur programme d'analyse en intégrant toutes les polykétides synthases de *M.tuberculosis*. Ainsi ils confirment par bio-informatique l'utilisation du malonyl par Pks1/15 et la prédisposition pour la condensation de méthyl-malonyl par la Pks2, Pks3/4 et Mas. Ces prédictions sont en accord avec les données métaboliques précédemment décrites pour ces composés. Il semble donc raisonnable d'utiliser leur programme pour envisager la nature du substrat condensé par le module de Pks5, supposé ainsi comme étant le méthyl-malonyl. Ainsi, et bien qu'aucune donnée à ce sujet n'ait été encore publiée, Pks5 serait un bon candidat pour la biosynthèse de l'acide mycolipanolique.

- **Le locus *pks 6***



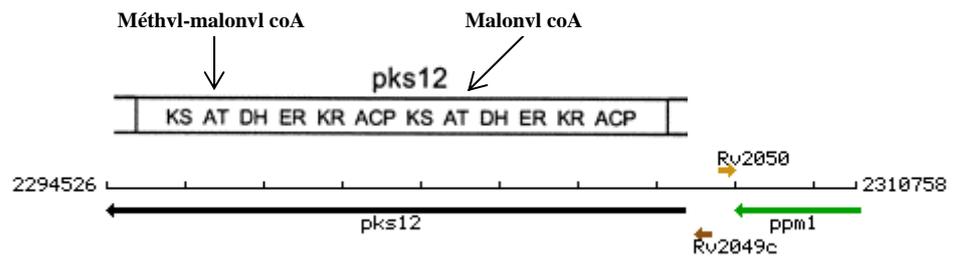
Cette polykétide synthase ne semble pas posséder de domaine optionnel. Toujours accompagnée génétiquement d'une acyl-AMP ligase, on note également la présence classique d'un transporteur de la famille des Mmpl. L'analyse bio-informatique du domaine AT ne prédit pas son implication dans la biosynthèse d'un lipide méthyl-ramifié puisqu'elle utiliserait plutôt du malonyl-coA. Bien que cette polykétide synthase ait été associée à la virulence de la souche MT103 suite à un criblage de mutants atténués en modèle murin, la nature du polykétide produit est resté en suspend (Camacho *et al.*, 1999).

- **Le locus *pks 7***

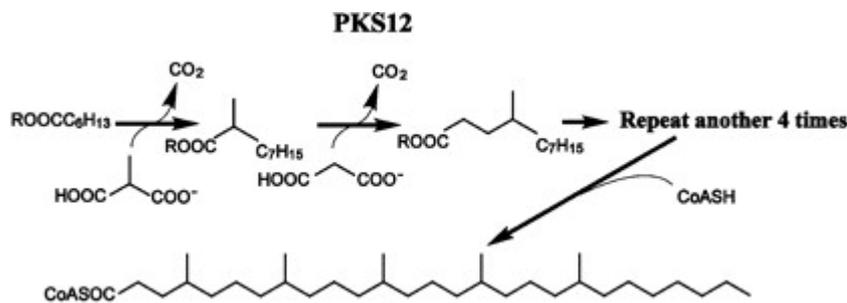


Ce locus fait apparaître visiblement six polykétides synthases codées par un même transcrit. En fait, à l'image de Pks3/4, les Pks8 et 17 présentent des modules complémentaires et s'associeraient fonctionnellement pour ne plus faire qu'une seule Pks de type « Mas-like », soit Msl5. De même, Pks7 présente une organisation comparable des domaines de Mas et a été renommé Msl4. L'analyse de la séquence protéique de Pks9 ne laisse pas présager la présence de domaines optionnels. Enfin le locus est encadré par les gènes des Pks 10 et 11 qui appartiendraient toutes deux au type III de la classification des Pks, soit aux chalcones synthases. Bien que l'analogie avec le modèle de biosynthèse de l'érythromycine laisse à penser que ce locus soit impliqué dans la biosynthèse d'une même molécule, les données bibliographiques qui le concerne le contredisent. En effet, l'inactivation ciblée de *pks7* vient perturber contre toute attente le métabolisme des DIMs (Rousseau *et al.*, 2003b). En effet, le métabolisme si bien décrit de ce lipide important pour la virulence n'autorise plus l'intégration d'une étape supplémentaire. Or, l'absence de complémentation fonctionnelle ne permet pas d'affirmer la véracité de ces résultats. De plus, le génome de *M.leprae* ne révèle pas l'existence de ce locus malgré la production de DIMs par ce micro-organisme. Peu de temps après, cette équipe publiait le même phénotype suite à l'inactivation de la première chalcone synthase du locus *pks10* (Sirakova *et al.*, 2003a). *A fortiori*, la même critique est donnée à ces résultats dont l'interprétation sera discutée à l'issue de la discussion de la première partie de ce manuscrit. Par contre, bien que toujours en absence de complémentation fonctionnelle, l'inactivation de *pks8/17* de ce locus implique cette Pks dans la biosynthèse d'acide gras insaturés méthylramifiés estérifiés minoritairement sur les PATs et le SL I. Leur formule brute s'étend de 16 à 18 carbones avec une à deux insaturations et une fonction méthyl en  $\alpha$  (Dubey *et al.*, 2003). Ces résultats montreraient à nouveau une multiplicité des substrats en terme de longueur et d'insaturation qui seraient métabolisés par Pks8/17. Cependant, ces données sont en désaccord avec la prédiction du substrat utilisé par cette Pks, qui suite à l'analyse de son domaine AT montre une prédilection pour le malonyl co-A, ce qui ne permettrait pas d'introduire la fonction méthyl précédemment décrite.

- Le locus *pks 12*



Ce locus contient un gène de polykétide synthase qui constitue le cadre de lecture ouvert le plus grand du génome de *M.tuberculosis*. Le poids moléculaire de l'enzyme correspondante, Pks12, est estimé à 430kDa. Elle révèle 12 domaines répartis sur deux modules d'élongation distincts. Des travaux récents ont permis de montrer que cette Pks était à l'origine d'un dérivé reconnu spécifiquement par une population clonale de lymphocytes T restreints au CD1c (Matsunaga *et al.*, 2004). En effet, le glycolipide à l'origine de cette reconnaissance est composé d'un acide gras méthyl-ramifié relié à un mannose via une liaison phosphodiester.

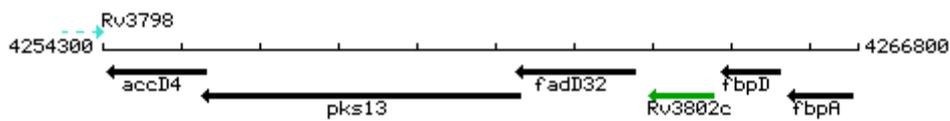


(Matsunaga *et al.*, 2004)

La présence de deux modules d'élongation prédits pour utiliser distinctement le méthyl-malonyl et le malonyl-coA permet l'apparition d'une ramification méthyl tous les quatre carbones. Le fonctionnement itératif des deux modules ainsi fonctionnellement associés, permet d'aboutir à la partie lipidique de la molécule structurellement identifiée comme ligand du CD1c et nommée mycokétide. Curieusement, *pks12* est situé dans le génome de *M.tuberculosis* à proximité du gène *ppm1* ayant été montré posséder une activité mannosyl-transférase *in vitro* sur des molécules de polyisoprényl-phosphate (Gurcha *et al.*, 2002). Ces molécules de structure comparable au mycokétide - si ce n'est la présence d'insaturation - ainsi glycosylées par Ppm1, seraient impliquées dans le transfert d'unités osidiques en constituant des donneurs de sucres. Par la suite, l'inactivation allélique de son homologue chez *C.glutamicum* a révélé son importance dans la biosynthèse des lipoglycannes

suite à la totale disparition de « lipomananne like » dans la souche mutante (Gibson *et al.*, 2003). L'analogie est hasardeuse mais il est possible d'envisager l'implication de Mt-ppm1 dans le transfert de résidu mannose à l'origine du mycokétide. La présence génétique de *pks12* peut également être corrélée à la production de Man-LAM par les souches du complexe tuberculosis. Il semble donc intéressant de regarder dans une telle souche mutée au niveau de *ppm1* ou de *pks12*, la présence de coiffes mannose branchées sur le LAM.

- **Le locus *pks 13***

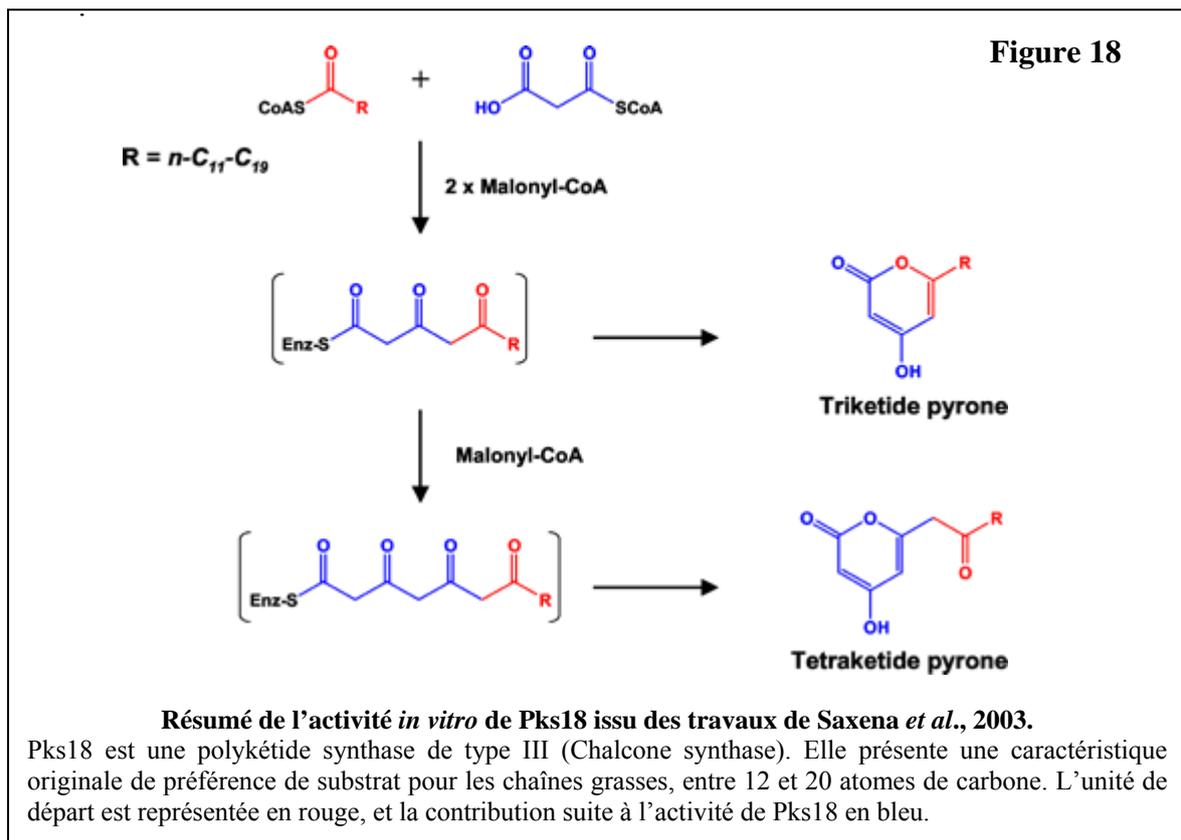


Le gène de *pks13* est flanqué de part et d'autre par une acyl-AMP ligase (FadD32) et une sous-unité d'une acyl-coA carboxylase (AccD4). Ces trois gènes semblent codés par un même transcrit puisque les régions intergéniques ne laissent pas la place à une séquence promotrice. On remarquera au passage la présence des Fbp décrites précédemment pour leur implication dans le transfert des acides mycoliques sur l'arabinogalactane (Belisle *et al.*, 1997). Cette polykétide synthase est une des rares Pks semblant présenter un homologue fonctionnel chez *M.leprae*. En réalité, l'opéron est intégralement retrouvé chez *M.leprae*. La dégénérescence du génome de ce dernier laisse à penser que la conservation de ce locus sous-entend certainement une fonction importante voire essentielle pour la mycobactérie. C'est pourquoi cette Pks sera considérée séparément des autres et constituera à elle seule la deuxième partie de cette étude.

- **Les loci *pks 16* et *pks 18***

Ces deux loci de polykétides synthases diffèrent notamment des autres par leur isolement. En effet, elles ne sont génétiquement associées à aucun gène généralement retrouvé (*papA*, *mmpl*, *fadD*). Pks16 n'est en réalité associée aux polykétides synthases que par l'annotation initiale du génome d'H37Rv. En effet, la méta-analyse de Yadav en 2003 ne décèle en fait aucun domaine à partir de sa séquence aminée. L'analyse de Pks18 montre qu'elle n'appartient pas aux polykétides synthases des deux premiers types mais au groupe

particulier des chalcones synthases. Une analyse *in vitro* de Pks18 a récemment révélé une préférence inhabituelle pour des substrats de départ à longue chaîne de C<sub>12</sub> à C<sub>20</sub>. L'activité caractérisée montre l'incorporation de deux ou trois molécules de malonyl-coA conduisant dans les deux cas à une cyclisation et à la formation d'un noyau pyrone (Figure 18) (Saxena *et al.*, 2003)



#### I.4.3) Situation du projet de recherche

A l'origine du projet, la plupart des données métaboliques associées aux Pks n'étaient pas connues. En fait, seules les fonctions des gènes *pps* et *mas* étaient attribuées à la biosynthèse des DIMs et l'implication de Pks2 dans la biosynthèse des phthiocéranates venait juste d'être publiée (Sirakova *et al.*, 2001). Cependant, les données convergeaient déjà vers l'importance des polykétides dans la structuration de l'enveloppe et la virulence des mycobactéries. D'une part, les polykétides non mycobactériens étaient connus pour fournir un grand nombre de molécules de notre pharmacopée. D'autre part, la toxine de *M.ulcerans* à l'origine de sa virulence était décrite comme un dérivé de polykétide (George *et al.*, 1999). Par ailleurs, l'analyse en aveugle de souches mutantes atténuées pour la virulence venait de révéler dans deux équipes indépendantes l'importance des loci des gènes *mas* et *pks6*, confirmant à nouveau l'activité biologique des polykétides dans la pathogénie (Camacho *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 1999). Enfin, la diversité et la complexité des lipides de l'enveloppe de *M.tuberculosis* déjà décrite comme composante essentielle de la virulence du bacille, nécessitait l'intervention de voies de biosynthèse lipidique originale, à l'image du nombre remarquable de gènes de polykétides synthases dans son génome. Ainsi le projet avait pour ambition de procéder à une approche systématique d'inactivation génique d'au moins un gène de polykétide synthase par locus précédemment décrit. La construction de telles souches recombinantes devait permettre d'une part d'attribuer le cas échéant leur contribution dans la pathogénie en modèle murin. En effet, cette stratégie permet de comparer rigoureusement deux souches ayant le même potentiel génétique initial pour leur capacité à se multiplier voire à décimer le modèle choisi. D'autre part, l'environnement scientifique et technique offrait la possibilité de rechercher les composantes de l'enveloppe affectées par la perte du polykétide en question. Cette approche systématique a donc été réalisée à la fois sur la souche de *M.bovis* BCG et sur la souche pathogène de référence *M.tuberculosis* H37Rv. En parallèle, une étude plus ciblée a été entreprise sur le locus de *pks13*. En effet, la conservation de ce locus chez *M.leprae* sous-entendait une fonction plus générale aux mycobactéries et des analyses préliminaires laissaient supposer la présence de ce locus chez *M.smegmatis*, dont le séquençage du génome était en cours. La conservation de ce locus même dans le génome d'une mycobactérie non pathogène rejetait son implication dans la pathogénie. Ainsi, l'étude de ce locus a été entreprise chez *M.smegmatis* pour son temps de génération rapide et sa manipulation sans confinement particulier.

## II) RESULTATS

### II.1) Approche systématique des loci Pks spécifiques de *M.tuberculosis*

#### II.1.1) Introduction aux outils génétiques d'inactivation génique

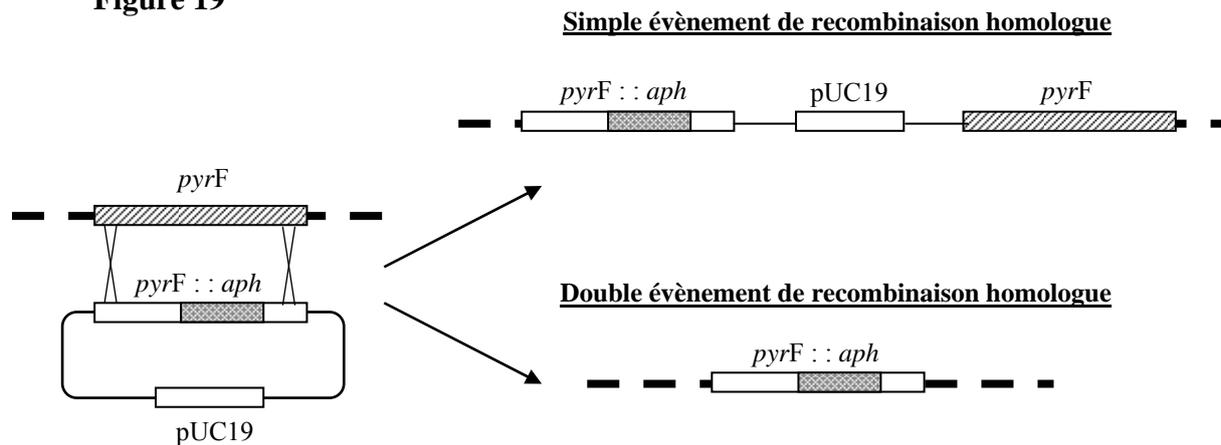
- Les vecteurs suicides pour la recombinaison homologue

La disponibilité d'outils génétiques fonctionnels dans un micro-organisme pathogène est utile à la caractérisation de déterminants de virulence. De tels déterminants sont autant de nouvelles cibles potentielles pour la recherche d'antituberculeux. Leur inactivation peut permettre d'une part, de générer des souches atténuées utilisables en vaccination, et d'autre part d'estimer le rôle de ces déterminants dans les mécanismes moléculaires de la pathogénicité. Dans ce contexte, deux types d'approches ont été entreprises.

La première, globale, a consisté à tenter de conférer à une souche pas ou peu pathogène un potentiel de virulence, suite à la réintroduction en *trans* de fragment d'ADN de la souche virulente d'H37Rv. Cette stratégie a permis notamment l'identification d'un facteur sigma d'H37Rv qui, introduit dans une souche atténuée de *M.bovis* est capable de restaurer les lésions histologiques de la souche virulente en modèle animal (Collins *et al.*, 1995).

La deuxième approche, spécifique, a consisté en l'inactivation chez *M.smegmatis* d'un gène impliqué dans le métabolisme de l'uracile : *pyrF* (Figure 19) (Husson *et al.*, 1990). La stratégie reposait sur le clonage du gène *pyrF* sur un vecteur dépourvu d'origine de réplication mycobactérienne. Ce dérivé du pUC19 constitue un vecteur « suicide » puisque son devenir sous forme plasmidique, sans origine de réplication mycobactérienne, est éphémère dans une mycobactérie transformée. L'unique événement qui permet à la mycobactérie de conserver un tel vecteur est de l'intégrer soit par recombinaison homologue, soit par insertion illégitime sur son chromosome. Pour sélectionner ces événements de recombinaison, les auteurs de ce travail utilisèrent une cassette de résistance à la kanamycine contenant le gène *aph* pour aminoglycoside phosphotransférase. L'introduction de l'*aph* au milieu du gène *pyrF* porté par le vecteur suicide constitue le substrat d'échange allélique ou AES. La transformation de *M.smegmatis* par le vecteur suicide correspondant suivi d'une sélection des transformants sur milieu contenant de la kanamycine a permis de sélectionner deux types d'évènements correspondant respectivement à un ou deux événements de recombinaison homologue.

**Figure 19**



**Schéma représentant les travaux de Husson et al, 1990.**

Deux types d'événements de recombinaison homologue sont sélectionnés sur kanamycine après transformation du substrat d'échange allélique dans *M.smegmatis*. 60% des colonies kanamycine résistantes présentaient un profil de simple événement en southern-blot et 40% pour le double. Noter la restitution d'une copie intacte du gène *pyrF* lors du simple événement. Une telle souche recombinante est dite mérodiploïde.

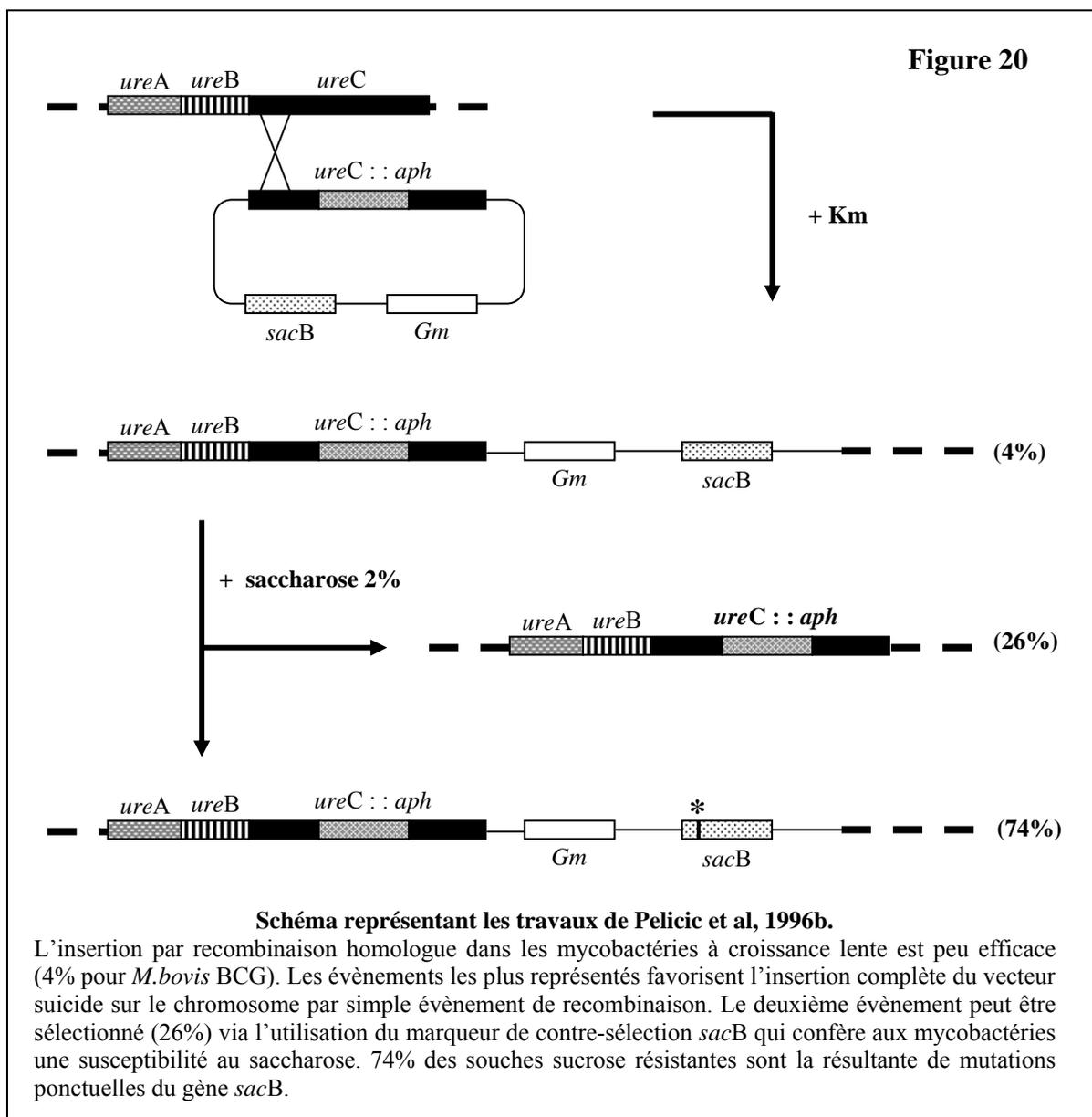
Ces premiers résultats de recombinaison homologue chez les mycobactéries ouvraient la voie, pour ses auteurs, à l'introduction de marqueurs antigéniques, et leur expression potentielle dans une souche fortement immunogène comme le BCG pour générer de nouvelles souches vaccinales. Ce premier succès de recombinaison homologue dans une souche de mycobactérie à croissance rapide fut bientôt contrasté par les tentatives d'inactivation par recombinaison homologue chez *M.bovis* BCG et *M.tuberculosis* d'un gène du métabolisme de la méthionine (Kalpana *et al.*, 1991). Les résultats obtenus ont révélé une proportion très importante d'insertion illégitime sans jamais laisser place à un événement de recombinaison homologue. Cette statistique défavorable serait notamment due à la structure génétique du gène *recA*. Cette protéine clé dans la recombinaison homologue bactérienne nécessite chez *M.tuberculosis* un épissage protéique catalysé par une intéine dont le gène est intégré dans celui de *recA*. La nécessité d'une maturation post-traductionnelle de RecA pourrait être à l'origine d'une régulation propre aux mycobactéries, responsable de la faible fréquence de recombinaison homologue (Pour revue, McFadden, 1996). La proportion inhabituelle d'insertion illégitime fut bientôt confirmée par une autre équipe. Sur 10 transformants de fragments d'ADN linéaires contenant l'AES du gène *uraA*, 80% révélèrent des insertions illégitimes de l'AES, contre 20% de simple événement de recombinaison d'une forme recircularisée de l'AES (Aldovini *et al.*, 1993). Or, la stabilité d'un simple événement de recombinaison sans pression de sélection (kanamycine) est faible, en particulier lors de

l'inactivation de gènes importants pour le métabolisme ou la virulence. Les premiers résultats relatant la construction d'un mutant par double « crossing-over » dans une mycobactérie à croissance lente furent obtenus dans *M.bovis* BCG lors d'une tentative d'inactivation du gène *ureC* par transformation d'un vecteur suicide linéarisé (Reyrat *et al.*, 1995). Les auteurs eurent à cribler 50 colonies résistantes à la kanamycine pour leur capacité à métaboliser l'urée ; seules deux colonies étaient négatives (4%). L'insertion par double « crossing over » fut confirmée pour l'une d'entre elles par southern-blot. Peu de temps après, l'inactivation du gène *mas* toujours dans BCG par un vecteur suicide non linéarisé permettait d'obtenir, sur 38 colonies, plusieurs insertions du plasmide par simple recombinaison, et un seul événement d'échange allélique (Azad *et al.*, 1996). Dans l'optique d'optimiser ces rendements, des essais encourageants furent réalisés dans *M.tuberculosis* par transformation d'AES linéaire de grande taille (40 à 50 kb) issu de cosmide (Balasubramanian *et al.*, 1996). La recombinaison de fragments linéaires par simple événement présente l'avantage d'être létale pour la bactérie puisqu'elle linéariserait le chromosome. Bien que la manipulation et la transformation de tels fragments soit délicate, les auteurs obtinrent une fréquence d'évènements d'échange allélique à hauteur de 6%. Cette faible progression soulignait la nécessité de développer de nouveaux outils plus adaptés pour les souches à croissance lente comme *M.tuberculosis*.

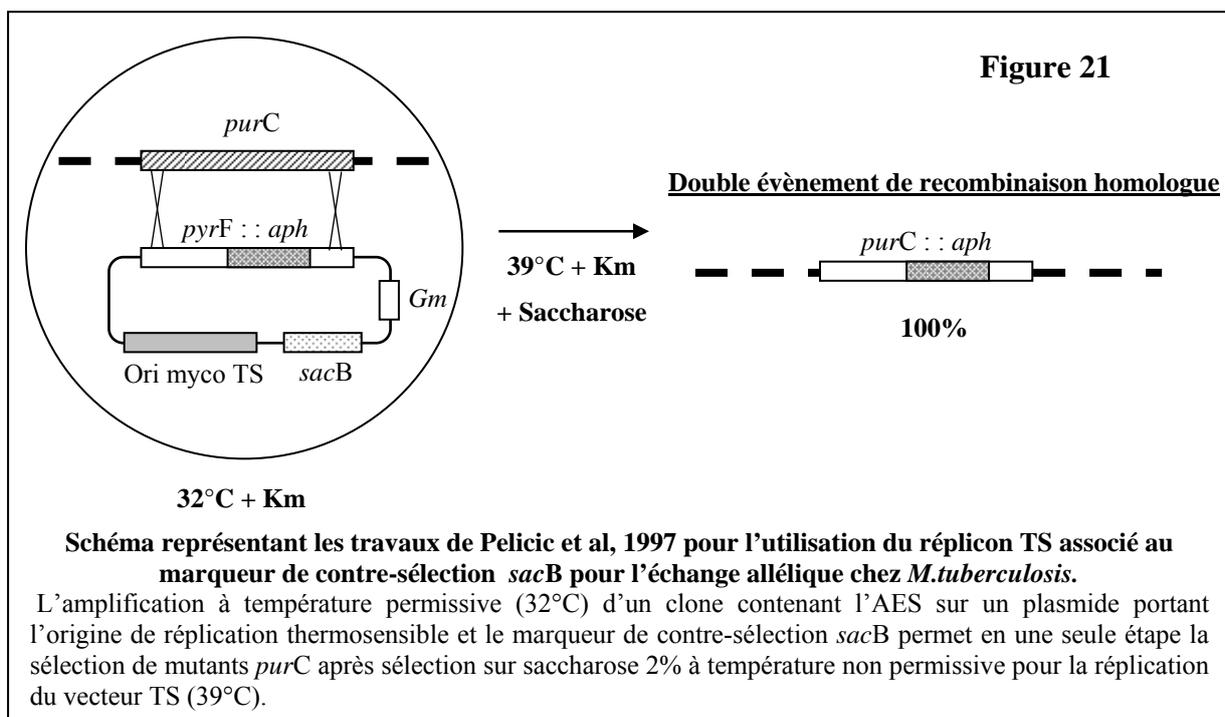
- La contre-sélection par le gène *sacB*

Ainsi, la fonctionnalité d'une cassette de contre-sélection *sacB* de *Bacillus subtilis* fut testée avec succès chez *M.smegmatis* et *M.bovis* BCG (Pelicic *et al.*, 1996a). Le gène *sacB* code une levane sucrase qui est sécrétée dans le périplasme des bactéries Gram négatifs et catalyse la transformation du saccharose, ou sucrose, en un polymère de fructose (levane) toxique pour la bactérie. L'utilisation de ce gène fut aussitôt appliquée à la contre-sélection de ce marqueur pour l'induction du deuxième événement de recombinaison homologue (Figure 20), événement statistiquement défavorable dans les souches de mycobactéries à croissance lente. L'insertion par simple événement de recombinaison homologue d'un vecteur suicide de l'AES ciblant le gène *ureC* de *M.bovis* BCG fut obtenu pour 4% des clones testés (Pelicic *et al.*, 1996b). Or le vecteur suicide (pJQ200) portait en plus de l'AES le marqueur de contre-sélection *sacB*. Ainsi, l'étalement sur milieu sélectif de l'AES (kanamycine) contenant 2% de saccharose, d'une souche recombinée par le simple événement précédemment décrit, a permis de sélectionner les bactéries qui avaient perdu le gène *sacB* (contre-sélection). Cette perte advient de deux façons : soit le gène *sacB* subit une mutation ponctuelle qui inactive la

protéine (fréquence 74%), soit le deuxième évènement de recombinaison excise le marqueur de contre-sélection qui, dépourvu d'origine de réplication mycobactérienne, sera perdu au fil des divisions (26%). Cette méthode de contre-sélection ouvrait la voie vers l'inactivation ciblée de tous les gènes potentiellement importants pour la virulence ou le métabolisme des mycobactéries à croissance lente. En effet, la possibilité de provoquer le deuxième évènement de recombinaison homologe permettait d'entreprendre la construction de souches « knock-out » ou mutantes stables. Cette interruption étant à priori irréversible, cela permettait d'envisager d'étudier l'effet d'une telle mutation en modèle animal dans lequel la pression de sélection par des antibiotiques n'est pas réalisable.



Par la suite, l'intérêt du marqueur de contre-sélection *sacB* fut amplifié suite à son association avec une origine de répllication mycobactérienne thermosensible (Figure 21) (Guilhot *et al.*, 1992). En effet, une des limites à l'inactivation de gènes chez *M.tuberculosis* par recombinaison homologue repose sur la faible efficacité de transformation qui limite le nombre d'évènements de rencontre entre l'AES et le chromosome bactérien. Malgré la sophistication des protocoles de compétence (Aldovini *et al.*, 1993), les efficacités sont au maximum de  $10^5$  par  $\mu\text{g}$  d'ADN. Cette fréquence de transformation égalant dans certaines études celle de recombinaison illégitime, il s'avérait intéressant de pouvoir amplifier une population de bactéries transformée par un plasmide vecteur d'une AES et de pouvoir chasser ce même plasmide dans des conditions précises. En effet, l'utilisation de vecteurs répliatifs avait déjà montré qu'ils favorisaient les évènements de recombinaison dans *M.bovis* BCG (Baulard *et al.*, 1996). Ainsi, l'association du réplicon thermosensible (TS) avec le marqueur de contre-sélection *sacB* a permis d'inactiver efficacement le gène *purC* dans *M.tuberculosis* (Pelicic *et al.*, 1997). La stratégie a consisté à intégrer sur un même plasmide l'AES du gène *purC*, le gène *sacB* et le réplicon TS. L'inactivation de *purC* induisant l'auxotrophie de la souche mutée pour un précurseur des purines (hypoxanthine), un transformant de *M.tuberculosis* ( $\text{Km}^R$ ) du plasmide précédemment décrit a été cultivé à température permissive pour le réplicon ( $32^\circ\text{C}$ ) en présence d'hypoxanthine. Cette amplification permet un enrichissement statistique des évènements de recombinaison.



L'étalement de cette culture sur milieu supplémenté en saccharose et à 39°C (température non permissive), toujours en présence de Km et d'hypoxanthine, permet de sélectionner en une étape, les bactéries qui ont intégré sur leur chromosome l'*aph*, et par la même occasion d'éliminer les simples événements de recombinaison qui sont sensibles au saccharose. L'analyse par southern-blot confirma le double événement de recombinaison homologue dans 100% des clones testés. Malheureusement, l'application de cette stratégie est délicate pour *M.bovis* BCG qui présente un défaut de croissance marqué à la température non permissive du réplicon de 39°C.

Une autre approche tout aussi élégante palliant aux problèmes d'efficacité de transformation de *M.tuberculosis* a consisté à utiliser la capacité naturelle d'infection des mycobactériophages. La caractérisation d'un phage lytique déficient pour la répllication à la température non permissive de 37°C, le phAE87, mais capable d'infecter et de se multiplier chez *M.smegmatis* à 30°C est à l'origine de ce travail (Bardarov *et al.*, 1997). La construction des particules phagiques à répllication thermosensible et vecteurs de l'AES est réalisée en plusieurs étapes. La première étape consiste à cloner l'AES dans un cosmide contenant une origine de répllication *E.coli* et le site *cos* d'encapsidation du phage  $\lambda$ . Le cosmide après ouverture par une enzyme de restriction est ligué *in vitro* en tandem avec l'ADN du phage TS précédemment décrit. La présence des sites *cos* du phage  $\lambda$  permet l'encapsidation *in vitro* par un kit commercial de l'ADN du mycobactériophage associé à l'AES. L'infection d'*E.coli* par ces particules permet la répllication et donc l'amplification du phasmide grâce à la présence de l'origine de répllication d'*E.coli* présente sur le cosmide. La purification d'une grande quantité d'ADN permet de transformer efficacement *M.smegmatis*. Dans ce cas, l'ADN du mycobactériophage est transféré dans un hôte propice à sa répllication, en tout cas à température permissive. Ceci permet de générer un grand nombre de particules phagiques. L'infection par ces particules phagiques de *M.tuberculosis* à un ratio de 10 pour 1 permet d'infecter statistiquement toutes les mycobactéries présentes. L'incubation à température non permissive des bactéries infectées empêche la répllication du phage. Par conséquent et de manière comparable à la stratégie du réplicon TS, seules les bactéries intégrant l'ADN phagique vont acquérir le marqueur de sélection apporté par l'AES. Comme l'ADN est linéaire, seuls les doubles événements maintiennent l'intégrité du chromosome. Ainsi, en étalant le mélange infectieux sur milieu sélectif, seuls des mutants du gène ciblé sont capables de survivre. Bien que récemment publiée (Bardarov *et al.*, 2002), cette technique a été appliquée avec succès lors de l'inactivation du gène *pcaA*, impliqué dans les décorations cyclopropane des acides mycoliques (Glickman *et al.*, 2000).

## II.1.2) Stratégie choisie pour cette étude

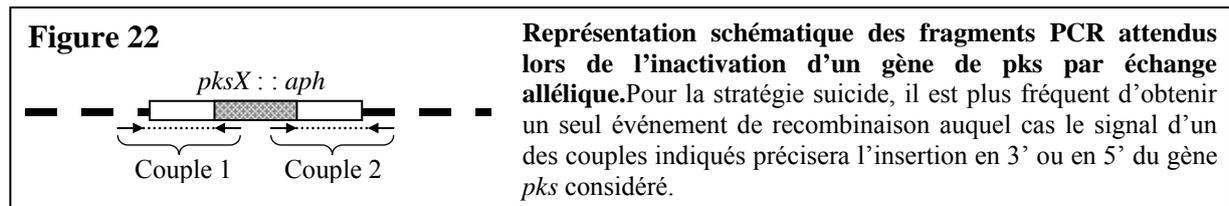
Dans ce contexte, l'inactivation des différents loci *pks* a été entreprise chez *M.bovis* BCG en utilisant la stratégie suicide associée à la contre-sélection *sacB* et chez *M.tuberculosis* en utilisant le réplicon TS également associé au marqueur de contre-sélection *sacB*. Les génomes de *M.bovis* et de *M.tuberculosis* sont très proches en terme de conservation de séquence (99,95%) (Garnier *et al.*, 2003). Par conséquent, les zones d'homologie amplifiées par PCR sur des extraits d'ADN génomique de *M.tuberculosis* H37Rv ont été utilisées à la fois pour l'inactivation de *M.bovis* BCG et de *M.tuberculosis*. Les AES ainsi construites ont pu être indépendamment clonées en vecteur suicide (pJQ200) et en vecteur réplcatif TS/*sacB* (pPR23). Le tableau suivant résume les amorces utilisées pour l'amplification des zones d'homologie, la taille des fragments amplifiés, le site utilisé pour l'insertion de l'*aph* et l'introduction ou non d'une délétion suite à cette insertion (Tableau 4).

**Tableau 4**

| Cible         | Amorces   | Taille | Insertion <i>aph</i> | Délétion |
|---------------|---|--------|----------------------|----------|
| <i>pks2</i>   | 2A : GC TCTAGA GTTTAAAC GCAATAAGACCGGCTG<br>2B : GC TCTAGA GTTTAAAC GCCATCTCGCAGTAGGC       | 3,4kb  | NruI                 | 1kb      |
| <i>pks3/4</i> | 4A : GC TCTAGA GTTTAAAC CTCGGCTGAGCAACTACAC<br>4B : GC TCTAGA GTTTAAAC CACCGGTGACGAGATAGG   | 3,9kb  | XhoI                 | 2kb      |
| <i>pks5</i>   | 5A : GC TCTAGA GTTTAAAC CGGCTACGCTGCTGTTTC<br>5B : GC TCTAGA GTTTAAAC GCGCACTCCGTCTTCGAG    | 2,1kb  | NruI                 | ×        |
| <i>pks7</i>   | 7A : GC TCTAGA GTTTAAAC GGGCGCTGCGTGAGCA<br>7B : GC TCTAGA GTTTAAAC GCCGACAAATCCATGTCC      | 3,7kb  | EcoRV                | 1,8kb    |
| <i>pks12</i>  | 12A : GC TCTAGA GTTTAAAC GTGCAGCCGTGGTTGGC<br>12B : GC TCTAGA GTTTAAAC CGCGGGTGTGTGCTTGAT   | 3,3kb  | NruI                 | 1,4kb    |
| <i>pks16</i>  | 16A : GACTAGT GTTTAAAC CGCAACACGTTCCAC<br>16B : GATATC GTTTAAAC CTGATCTGTTGGTGGTCAACG       | 3,4kb  | PstI (Hygro)         | ×        |
| <i>pks18</i>  | 18A : GC TCTAGA GTTTAAAC TCGAGCACGCTAATGACC<br>18B : GC TCTAGA GTTTAAAC GGCACACTACGGCCTCGTG | 2,1kb  | EcoRV                | 500bp    |

Les fragments PCR ont été sous-clonés en pUC18 pour l'insertion de la cassette de résistance. L'AES ainsi générée a pu être soit intégrée en pJQ200 soit en pPR23. A mon arrivée, toutes les AES, à l'exception de *pks7* étaient déjà sous-clonés en pUC18. J'ai donc réalisé la construction de l'AES de *pks7* et effectué son transfert avec les autres en pJQ200.

J'avais donc en charge d'inactiver les différents gènes ciblés dans *M.bovis* BCG. L'inactivation des gènes de *M.tuberculosis* nécessitant des expérimentations en degré d'isolement P3 et n'ayant pas l'agrément à ce moment, cette partie du projet a été réalisée par mon directeur de thèse, le D<sup>r</sup> Christophe GUILHOT. Le criblage des mutants par échange allélique est réalisé par PCR, en utilisant une amorce externe à la zone d'homologie et une amorce dans l'*aph* (Figure 22).



Une anticipation technique nous a permis de réaliser plusieurs mutations successives en excisant l'*aph* entre chaque événement d'échange allélique. La cassette de résistance utilisée pour l'inactivation des *pks* est flanquée par deux sites nommés « res » qui sont le substrat d'une activité enzymatique originale. Ces sites sont reconnus par une enzyme, la résolvasse du transposon  $\gamma\delta$ , qui catalyse l'excision de fragments d'ADN lorsqu'ils sont entourés de deux sites « res ». Cette propriété a été fonctionnalisée au laboratoire chez les mycobactéries (Malaga *et al.*, 2003). Le gène de la résolvasse a été cloné sous le contrôle d'un promoteur mycobactérien dans le vecteur pPR23 contenant le réplicon TS et le marqueur de contre-sélection *sacB*. La transformation de mutant *pks::res-aph-res* par ce vecteur a permis l'expression de la résolvasse et l'excision de l'*aph*. Le vecteur d'expression de la résolvasse a pu être chassé du mutant devenu Kanamycine sensible, sur saccharose et à température non permissive. L'excision de l'*aph* permet l'utilisation ultérieure d'autres AES construites sur le même schéma et l'interruption d'un autre gène de *pks* pour réaliser des combinaisons de mutations.

### II.1.3) Bilan des expérimentations pour l'obtention des souches mutantes

Le bilan de cette partie est très positif puisque tous les gènes de polykétide synthase ciblés pour le projet ont pu être mutés (Tableau 5 et 6).

**Tableau 5**

| <b>Stratégie TS/sacB dans <i>M.tuberculosis</i> H37Rv</b> |                                |                          |
|---|--------------------------------|--------------------------|
| Gène cible  | Clones testés <sup>( )</sup>   | Mutant(s) <sup>( )</sup> |
| <i>pks2</i>   | 2 - 8                          | 8                        |
| <i>pks3/4</i>   | 3 - 1 - 4 - 1 - 3              | 2                        |
| <i>pks5</i>   | 5 - 5                          | 5                        |
| <i>pks7</i>   | 10                             | 1                        |
| <i>pks12</i>  | 5 - 2 - 1 - 8 - 1 - 6 - 8 - 10 | 1                        |
| <i>pks18</i>  | 5 - 1 - 3 - 1 - 3 - 5 - 4      | 1                        |

( ) Chaque chiffre correspond au nombre de colonies issues d'une expérience indépendante

( ) Ce chiffre correspond au nombre de mutants obtenus lors de la dernière expérience

**Tableau 6**

| <b>Stratégie Suicide/sacB dans <i>M.bovis</i> BCG</b> |                                |                       |                       |
|---|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Gène cible  | Transformations <sup>( )</sup> | Clones <sup>( )</sup> | Mutant <sup>( )</sup> |
| <i>pks2</i>   | 6 (pDP06)                      | 20                    | +                     |
| <i>pks3/4</i>   | <b>13</b> (pDP07)              | 85                    | -                     |
| <i>pks5</i>   | 6 (pDP08)                      | 31                    | +                     |
| <i>pks7</i>   | <b>12</b> (pDP04)              | 65                    | - (+)                 |
| <i>pks12</i>  | 9 (pDP10)                      | 35                    | + (+)                 |
| <i>pks16</i>  | 7 (pDP20)                      | 13                    | +                     |
| <i>pks18</i>  | 9 (pDP12)                      | 44                    | +                     |

( ) Nombre de transformation effectuée par le plasmide précisé entre parenthèse

( ) Cumul des colonies obtenues sur la totalité des transformations

( ) (+) indique l'obtention ultérieure du mutant par transduction de phages TS

Cependant, l'échéancier est nettement dépendant du locus considéré. Il est acceptable d'incriminer la préparation des cellules compétentes pour l'obtention de mutants par la stratégie suicide, d'autant plus qu'au fil des préparations, l'efficacité de transformation augmentait parallèlement au nombre de colonies à tester générant autant de mutants potentiels. D'ailleurs, il apparaît clairement que lors de la sixième tentative de transformation,

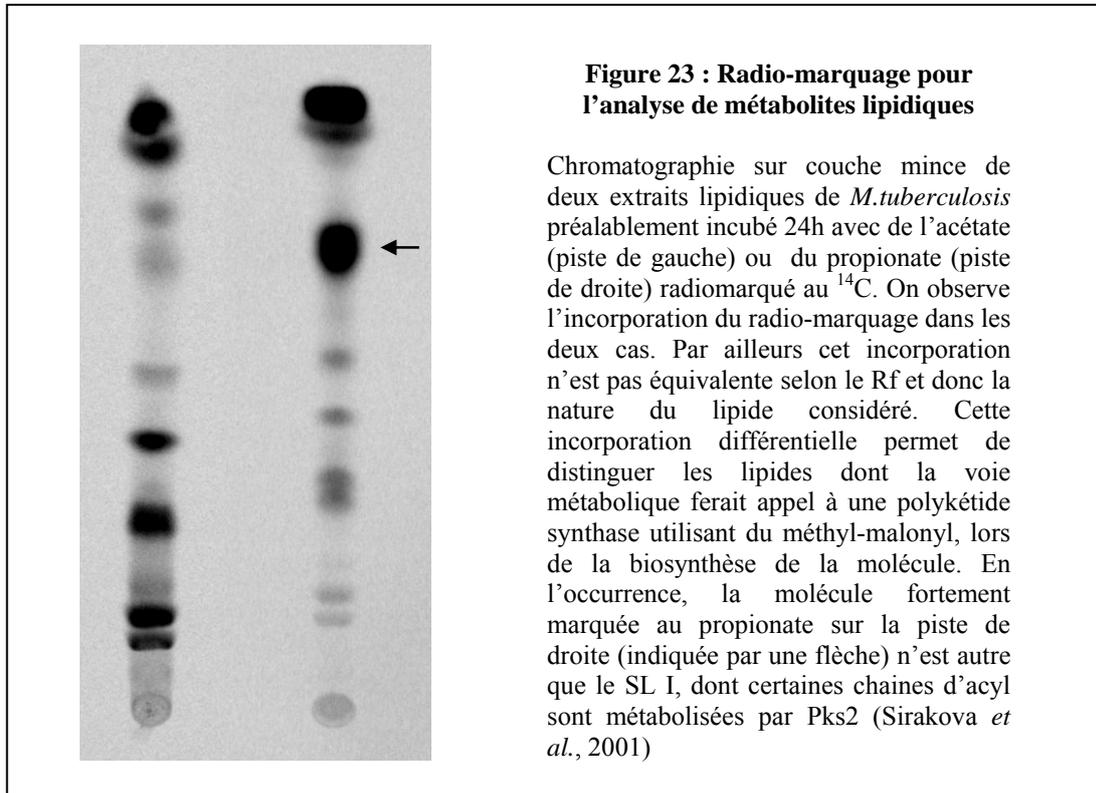
la situation s'est brusquement débloquée, permettant l'obtention des mutants *pks2* et *pks5* puis celui de *pks16* à la septième, et finalement ceux de *pks12* et *18* à la neuvième. Pourtant la persévérance n'a pas suffi à obtenir les mutants de *pks3/4* et *pks7* après respectivement 13 et 12 tentatives de transformations. Cette obstination est d'autant plus étrange que pour *pks7*, la même construction utilisée en stratégie TS/*sacB* dans *M.tuberculosis* n'a nécessité qu'une seule expérience. Les travaux de Dubey et al. en 2002 dévoilant la fonction de *pks3/4* dans *M.tuberculosis* H37Rv, il devenait moins intéressant de persévérer d'avantage. Par contre, la publication des travaux de Bardarov et al. en 2002 nous a permis de demander à ses auteurs de mettre à disposition leurs outils pour tenter de débloquer la situation vers l'obtention du mutant *pks7* dans *M.bovis* BCG. La mise en place du système de transduction des phages TS par Wladimir MALAGA au laboratoire, nous a finalement permis d'isoler le mutant *pks7* dès la première expérience de transduction.

#### II.1.4) Analyse biochimique globale des mutants de Pks

Au regard des données bibliographiques, la probabilité que les produits des polykétides synthases mycobactériennes soient de nature lipidique et donc hydrophobe était forte. Le comportement apolaire des lipides permet de les purifier facilement par extraction passive en solvants organiques (§Matériels et méthodes). Cependant, les extraits lipidiques de souches du complexe *M.tuberculosis* sont majoritairement composés de quelques dérivés du tréhalose (MMT, DMT, PAT, DAT, SL) et de phtiocérol dimycosérosate (DIMs, PGL). Par conséquent, l'analyse brute des lipides extraits en chromatographie sur couche mince est efficace pour détecter ces composants majoritaires des lipides extractibles mycobactériens. La caractérisation de molécules moins représentées reste délicate. En cela, l'utilisation de radio-éléments précurseurs des lipides comme des polykétides, permet d'abaisser le seuil de détection et de limiter l'analyse aux composés d'intérêt dont la visualisation pourrait être gênée par ces composants majoritaires. De plus, le radio-marquage facilite la normalisation des dépôts en CCM pour une quantification comparable des extraits bruts marqués entre les souches sauvages et les mutants *pks*.

Il est possible de fournir dans la culture bactérienne des précurseurs acétate ou propionate marqués par un isotope radioactif du carbone, le  $^{14}\text{C}$ . Ces radioéléments sont métabolisables par la mycobactérie et seront intégrés dans toutes les voies métaboliques concernées (Figure 23). Or, une proportion non négligeable des polykétides synthases ciblées

sont prédites pour condenser des unités méthyl-malonyl (Yadav *et al.*, 2003). Cette unité de condensation est obtenue par incorporation d'une molécule de CO<sub>2</sub> sur la molécule de propionate, réaction catalysée par une acyl-coA carboxylase. Marqués au <sup>14</sup>C, l'acétate et le propionate sont disponibles commercialement.

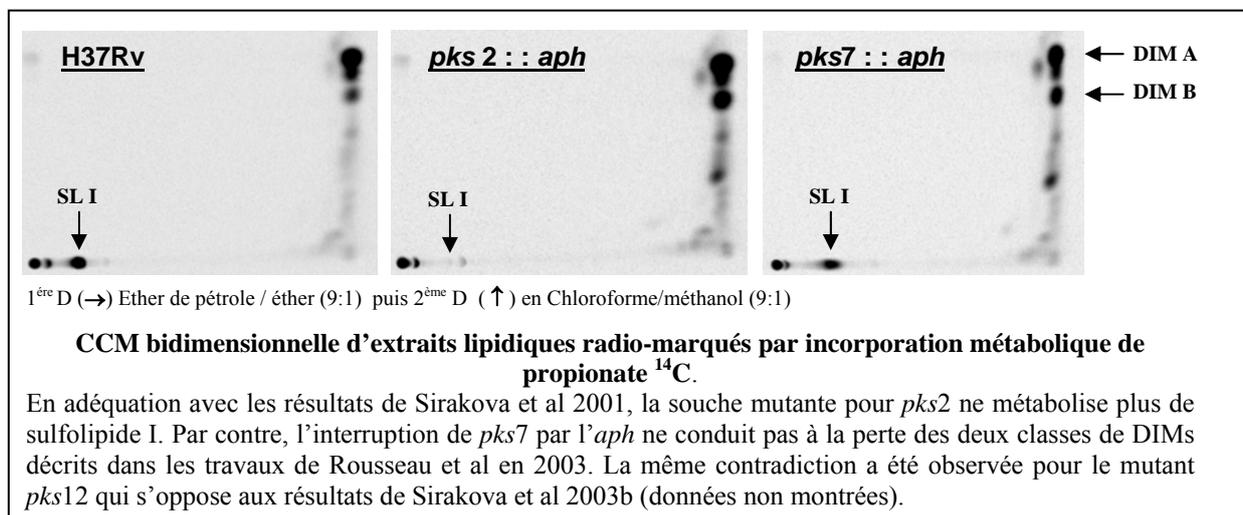


Une incubation suffisamment courte, équivalente à un temps de génération, est suffisante pour marquer spécifiquement de tels métabolites. Ainsi, on peut noter le marquage préférentiel par incorporation de propionate radiomarqué dans le sulfolipide I (SLI) métabolisé par *M.tuberculosis* H37Rv. En effet, Pks2 catalyse l'élongation de chaînes d'acides gras saturés en C<sub>16</sub> à C<sub>20</sub> par incorporation itérative de 6 à 7 résidus de méthyl-malonyl provenant de propionyl-coA (Sirakova *et al.*, 2001).

Ainsi, nous avons entrepris d'élucider la nature des métabolites des différentes Pks en comparant l'incorporation de ces précurseurs marqués entre la souche sauvage et les souches contenant les Pks inactivées, selon leur prédisposition pour la condensation de malonate ou de méthyl-malonate. Nous avons réalisé l'étude du « métabolome lipidique » lié au propionate pour les mutants *pks* 2, 5, 7, et 12 et le métabolome lipidique lié à l'acétate pour les mutants *pks* 7 et 18. Bien que Pks7 soit censé utiliser du méthyl-malonyl-coA, sa présence au sein

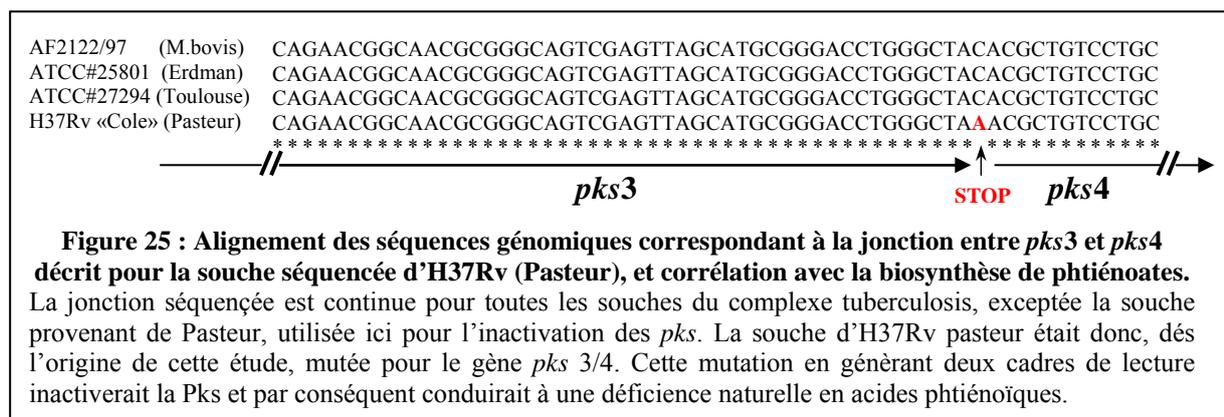
d'un locus contenant 4 autres Pks prédisposées à utiliser du malonyl-coA permet d'envisager que le polykétide synthétisé par ce locus soit davantage marqué par l'acétate que par le propionate à activité spécifique équivalente. Malgré le criblage d'une panoplie de mélange de solvants pour tenter de résoudre un maximum de zones de polarité, aucune différence reproductible n'a pu être détectée entre les métabolomes des mutants et ceux des souches sauvages. Exceptés les résultats de Sirakova *et al.* de 2001 concernant la disparition du SL I dans le mutant *pks2*, nos résultats vont même à l'encontre de plusieurs publications (Figure 24). En effet, l'inactivation des gènes *pks 7* et *12* n'empêche pas les souches résultantes de métaboliser les DIMs, contrairement à certaines données référées (Rousseau *et al.*, 2003b; Sirakova *et al.*, 2003b).

**Figure 24**



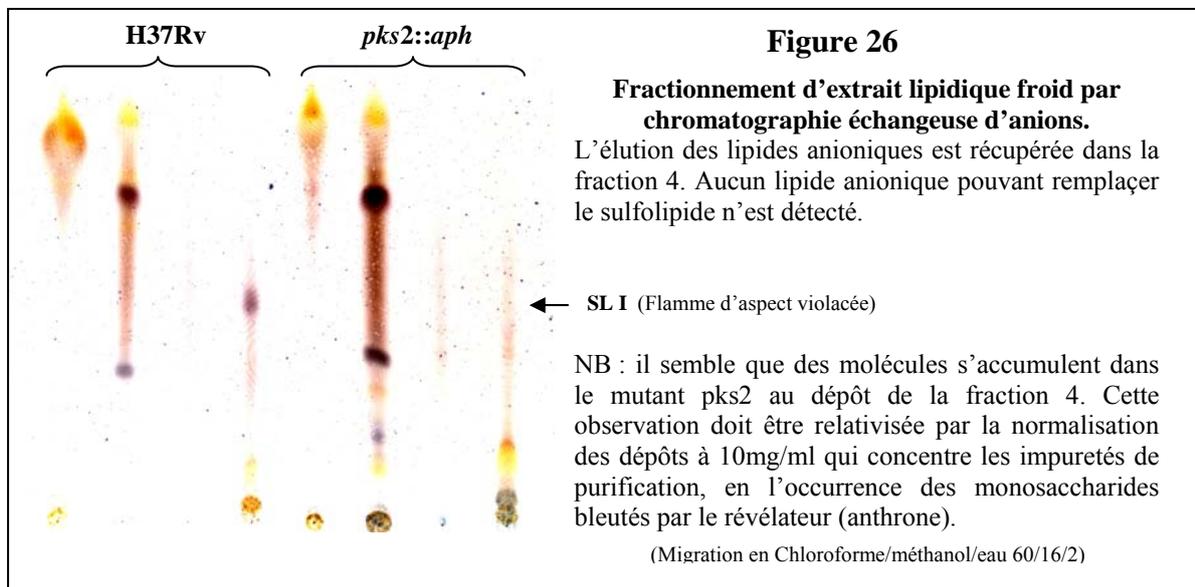
Par ailleurs, nous avons cherché à confirmer l'absence de polyacyl-tréhalose (PATs) suite à l'inactivation de *pks3/4* dans H37Rv, provoquant l'arrêt de la biosynthèse des acides phtiénoïques (Dubey *et al.*, 2002). Ces acides gras méthyl-ramifiés nécessitent l'incorporation de méthyl-malonyl et peuvent être également détectés par marquage métabolique au propionate radioactif. Les PAT sont résolus en chromatographie sur couche mince par un mélange d'éther de pétrole/acétone (92 :8). Pourtant, ce type de migration ne nous a pas permis de détecter cette molécule dans la zone attendue. De plus, l'analyse chromatographique en phase gazeuse d'une fraction saponifiée des lipides extractibles de la souche sauvage, ne nous a pas permis d'identifier le pic correspondant aux acides phtiénoïques (P27) dont la présence avait été caractérisée pour son intérêt taxonomique (Daffe *et al.*, 1983). Or l'inactivation de *pks3/4* dans les travaux de Dubey *et al.* de 2002 a été réalisée sur un isolat de la souche d'H37Rv (ATCC#25618) différent de notre souche de

travail H37Rv « Strain Lab » de l'institut Pasteur correspondant en l'occurrence à la souche dont la séquence génomique est disponible (Cole *et al.*, 1998). Les auteurs ont identifié par approche protéomique Pks3/4 dans des extraits protéiques de l'ATCC#25618. Ils ont relevé la présence d'un peptide chevauchant entre la fin de Pks3 et le début de Pks4, mettant ainsi en évidence l'existence d'un seul cadre de lecture pour ces deux gènes de *pks*. Nous avons donc entrepris de séquencer la zone de jonction entre *pks3* et *pks4* pour étudier si un polymorphisme génétique ne corrélait pas au phénotype biochimique de composition en acides phtiénoïques (Figure 25). Les séquences montrent que seule la souche pasteur d'H37Rv présente deux cadres ouverts de lecture pour les gènes des *pks* 3 et 4. Ce polymorphisme repose sur une mutation ponctuelle qui introduit un codon stop dans le gène de la Pks3 sans modification du cadre de lecture de la Pks4. Or, l'ATCC#27294 ayant servi aux travaux de Daffé *et al.* en 1983 et maintenue à Toulouse, ne possède pas cette mutation. Nous pouvons donc corréler la présence de ce polymorphisme dans le gène *pks3/4* à la biosynthèse des acides phtiénoïques. La souche utilisée dans cette étude est donc naturellement délétée de l'activité de cette polykétide synthase et donc de phtiénoates.



Par ailleurs, l'absence de phénotype d'atténuation en modèle murin pour la souche d'H37Rv déficiente en sulfolipide (*pks2::aph*) annoncé en janvier 2001 lors d'une communication orale par Barry.C III<sup>rd</sup>, puis confirmé par la publication d'une autre équipe dans différents modèles (Rousseau *et al.*, 2003c) nous avait amené à reconsidérer l'importance des acides phtiocéraniques dans l'activité du sulfolipide. Cette considération nous a conduit à poser l'hypothèse de l'importance du tréhalose sulfate dans l'activité du sulfolipide par une compensation de la perte de l'acylation des acides phtiocéraniques par l'estérification d'acides gras de nature différente sur le tréhalose sulfaté. L'hypothèse reposait donc sur la persistance de tréhalose sulfaté acylé de polarité différente et non détecté dans l'étude de Sirakova en 2001. Pour tester cette hypothèse, nous avons entrepris la purification

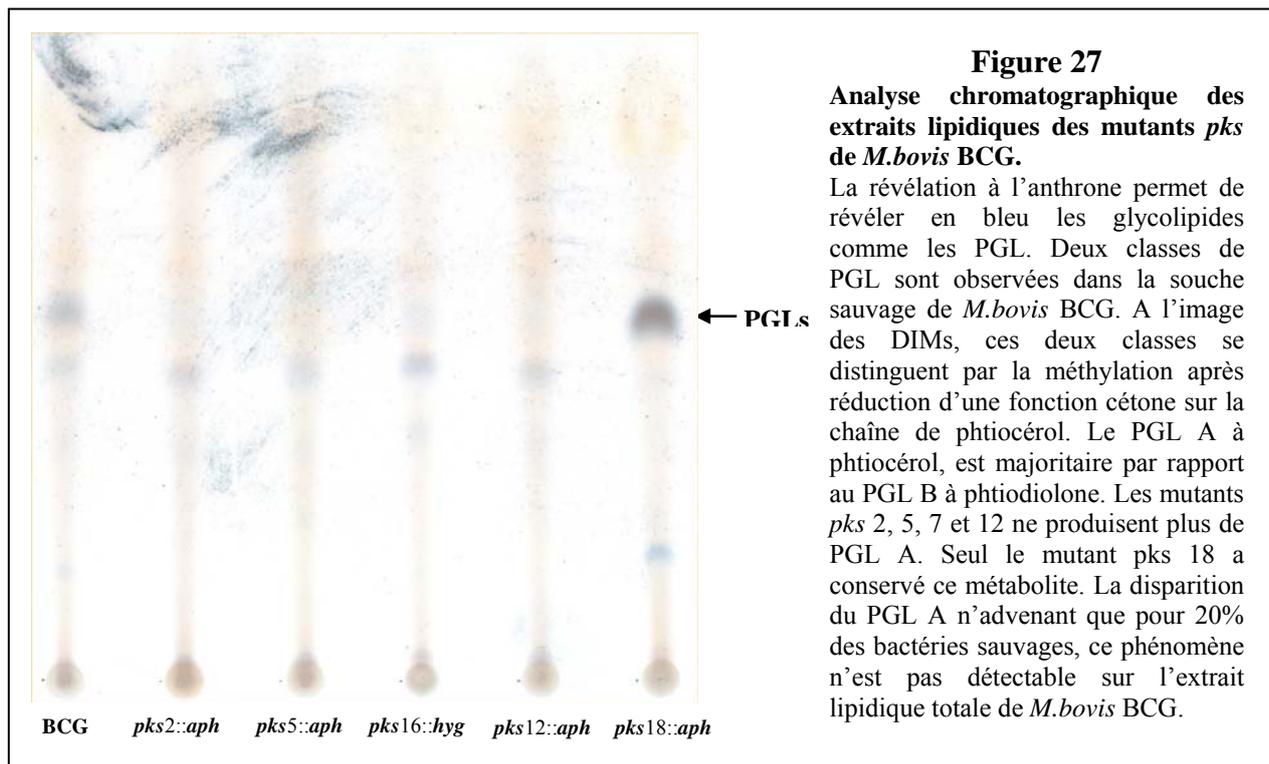
du sulfolipide par chromatographie d'échange d'ions (Figure 26). Ce type de purification étant basée sur l'état de charge du lipide conféré par le sulfate, elle n'est en rien dépendante de la nature des groupements acylés sur le tréhalose.



Les résultats obtenus montrent l'absence de lipides anioniques significativement détectables dans l'extrait lipidique du mutant *pks2*. Ces données furent confirmées par un marquage au sulfate radioactif ( $^{35}\text{S-SO}_4^{2-}$ ) d'un mutant équivalent lors d'une analyse fonctionnelle du transporteur Mmpl8 (Converse *et al.*, 2003). A posteriori, ces résultats sont en accord avec le modèle de biosynthèse de ce dérivé du tréhalose qui, suite à ces travaux, montre que l'acylation du sulfolipide par les phthiocéranates est postérieure ou concomitante à son transport dans l'enveloppe externe de *M.tuberculosis*. Il semblerait qu'il y ait une sorte de coopération entre le transfert des polykétides produit par Pks2 et un transport spécifique de ce tréhalose sulfaté acylé par Mmpl8.

L'analyse à froid des extraits lipidiques des mutants *pks* de *M.bovis* BCG a également laissé apparaître la disparition irrationnelle d'une forme de PGL comparable à la disparition contradictoire des DIMs de mutants Pks de *M.tuberculosis* H37Rv citée précédemment (Figure 27). En effet, le profil chromatographique d'extraits lipidiques pour quatre de nos mutants sur cinq a révélé la disparition de PGL à phthiocérol (PGL A) dans ces souches recombinantes. Seul le mutant *pks18* a conservé sa capacité à produire le PGL A. L'artefact

fut élucidé grâce à l'analyse par Wladimir MALAGA de multiples isolats de la souche parentale de *M.bovis* BCG utilisée pour les transformations des vecteurs suicides. La production de PGL A était naturellement altérée pour 20% des isolats. Par conséquent, la population sauvage de *M.bovis* BCG utilisée pour inactiver les gènes de *pks* présente un polymorphisme génétique pour la biosynthèse de ce glycolipide. Il s'avère que pour une raison indéterminée les échanges alléliques soient préférentiellement advenus dans ces variants naturels déficients pour la production de PGL A.



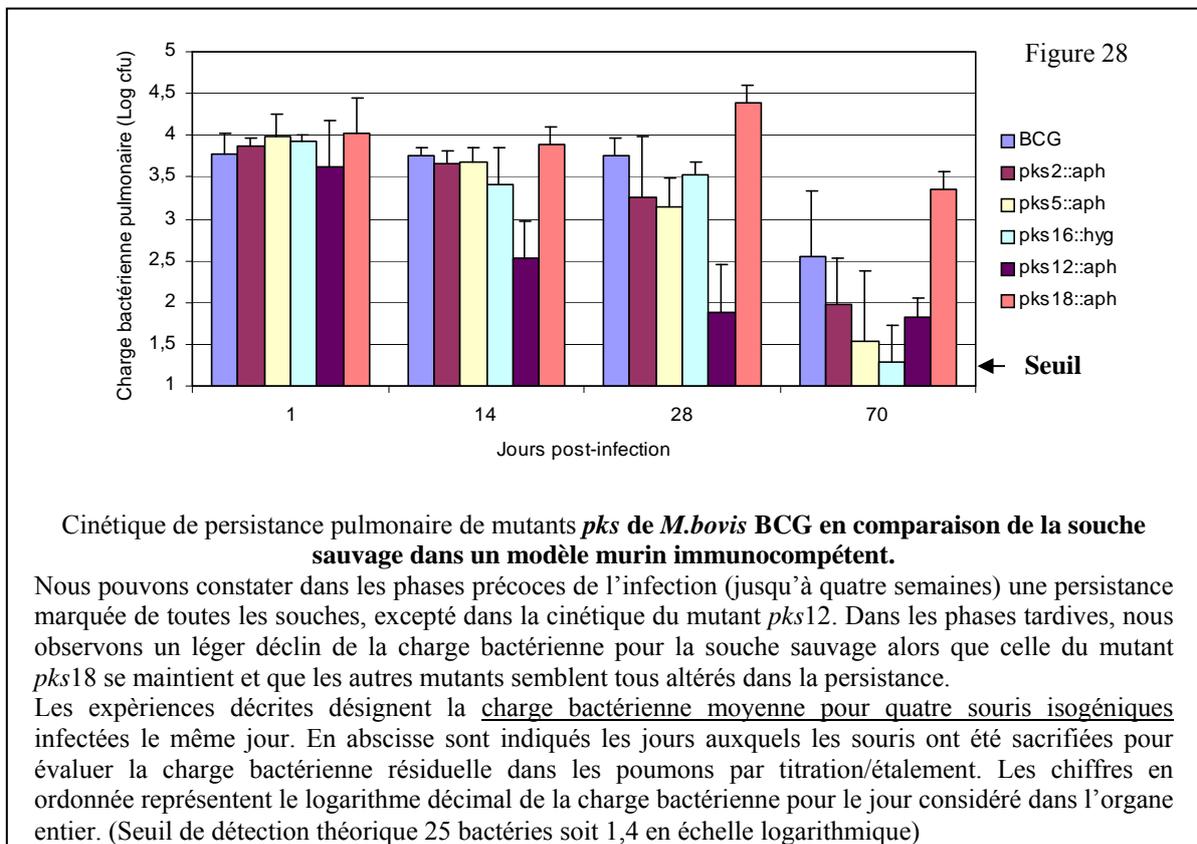
En résumé, cette étude de l'activité biosynthétique des Pks nous a permis de confirmer l'implication de Pks2 dans le métabolisme des phtiocéranates et hydroxyphtiocéranates greffés sur le tréhalose sulfate pour former le SulfoLipide I. Nous confirmons également par corrélation génétique le rôle de Pks3/4 dans la biosynthèse des acides phtiénoïques pour le métabolisme des PolyAcylTréhalose. Par contre, nous infirmons l'implication des Pks7 et 12 dans la biosynthèse des DIMs sans apporter plus d'informations sur leur réelle fonction. Enfin, nous n'avons pu détecter les métabolites des Pks5 et 18 par notre approche.

### II.1.5) Analyse de la virulence résiduelle des mutants de Pks

En parallèle de cette recherche des métabolites issus de l'activité des Pks du complexe tuberculosis, nous avons entrepris d'étudier la virulence résiduelle de chaque mutant en modèle murin. Cette approche consiste en l'inhalation de bacilles sauvages ou mutés par les voies aériennes de souris immuno-compétentes pour observer, selon la souche de départ, la multiplication et/ou la persistance des bacilles dans les poumons et la rate des souris infectées. En effet, les bacilles de *M.bovis* BCG et ceux de *M.tuberculosis* ne présentent pas le même comportement de multiplication dans les poumons de souris. Les bacilles tuberculeux sont capables de s'y multiplier contrairement aux bacilles de la souche vaccinale. Par conséquent, la dose infectieuse est importante pour ces derniers qui, à défaut de se multiplier, sont capables de persister plusieurs mois dans les poumons de souris et sont éliminés très progressivement (d'où leur potentiel vaccinal). Pour cette raison, la dose infectieuse inoculée pour la souche sauvage et les mutants *pks* de *M.bovis* BCG est instillée de manière à obtenir lors de la titration 24 heures après l'infection, environ  $10^4$  bactéries dans les poumons. Par contre, l'inoculum des souches sauvages ou dérivés de *M.tuberculosis* doit être le plus faible possible ( $\approx 10^2$  bactéries), de manière à pouvoir observer la multiplication dans les stades précoces de l'infection jusqu'à l'atteinte d'un plateau aux environs de  $10^6$  bactéries pour l'ensemble des poumons. Il semble à première vue redondant de réaliser ce type de cinétique à la fois dans *M.bovis* BCG et *M.tuberculosis*. Pourtant, les deux approches sont complémentaires. La perte d'un facteur de virulence pourrait passer inaperçue dans une souche déjà atténuée alors que son effet serait déterminant pour la virulence d'une souche pathogène. A l'inverse, la souche pathogène pourrait compenser la perte d'un facteur de virulence alors que dans une souche déjà atténuée, cette modification abolirait définitivement sa capacité résiduelle à persister.

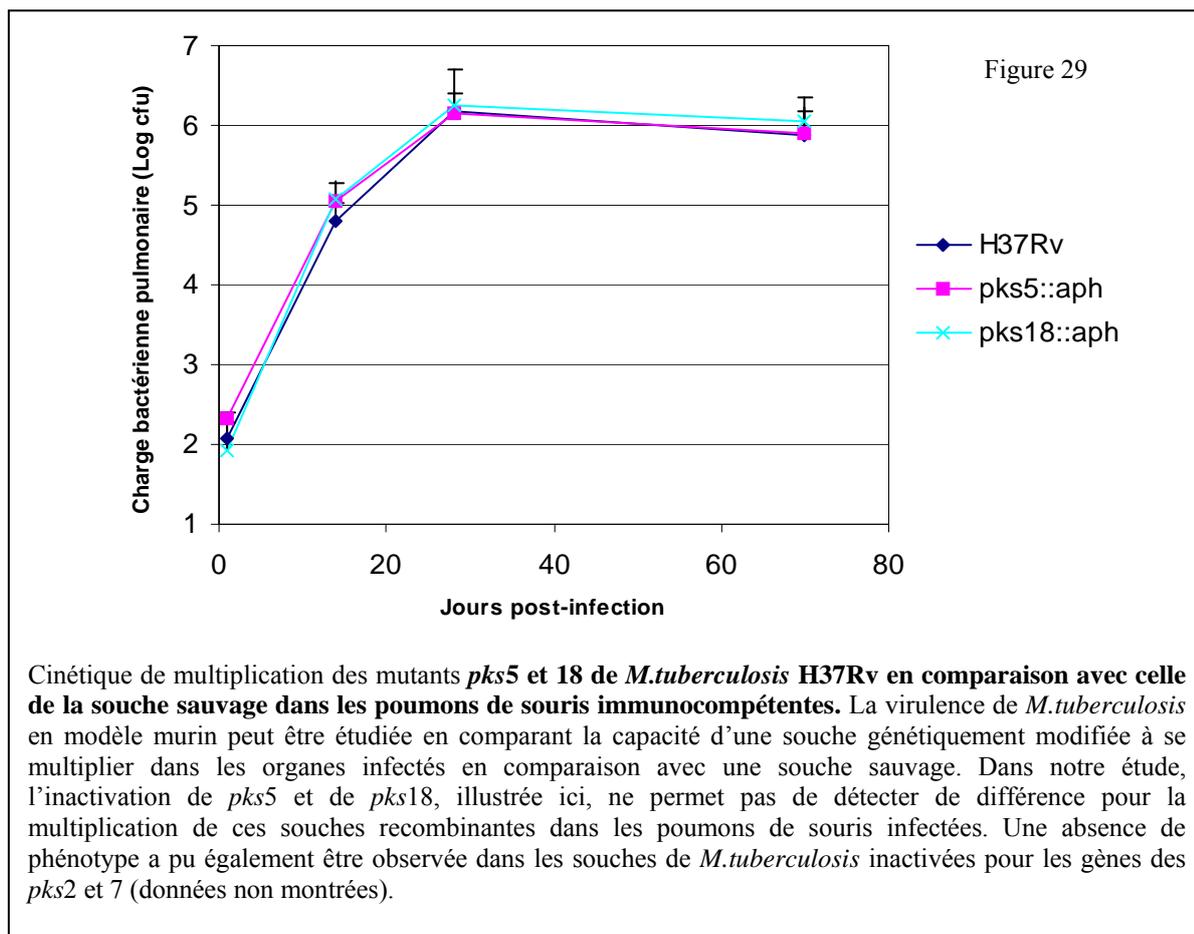
L'étude de la persistance résiduelle des mutants *pks* de *M.bovis* BCG a été réalisée lors d'une expérience globale (Figure 28), et ce, avant de mettre en évidence le problème de variation de production du PGL A. Cette variation est primordiale pour l'interprétation des résultats. Bien qu'altérant la pertinence de ces expériences, des résultats probants sont extrapolables. Commençons par examiner le comportement de la souche sauvage de *M.bovis* BCG. Nous avons pu observer, comme attendu, la persistance stable de la charge bactérienne dans les poumons des souris pendant les quatre semaines ayant suivi l'infection. Le dernier point effectué dix semaines après l'infection, indique un fléchissement du nombre de

bactéries persistantes. Le mutant *pks18* est le seul à avoir conservé le métabolisme du PGL A. Son inactivation ne semble pas altérer la persistance des bactéries dans les quatre premières semaines et le fléchissement de la charge bactérienne à 10 semaines est moins marqué, comparé à la souche sauvage. Les mutants *pks 2, 5, 12* et *16* ont tous perdu leur capacité à produire du PGL A. En cela, ils sont comparables et nous considérerons qu'ils ne diffèrent que par l'inactivation du gène *pks*. La cinétique d'infection montre une persistance pendant les quatre premières semaines uniquement pour les mutants *pks 2, 5* et *16*. En effet, la charge bactérienne pulmonaire pour le mutant *pks12* est réduite d'un tiers à 2 semaines et de plus de 60% à quatre semaines post-infection. Enfin, la persistance dans les phases tardives de l'infection (10 semaines) est nettement réduite pour toutes ces souches déficientes en PGL A.



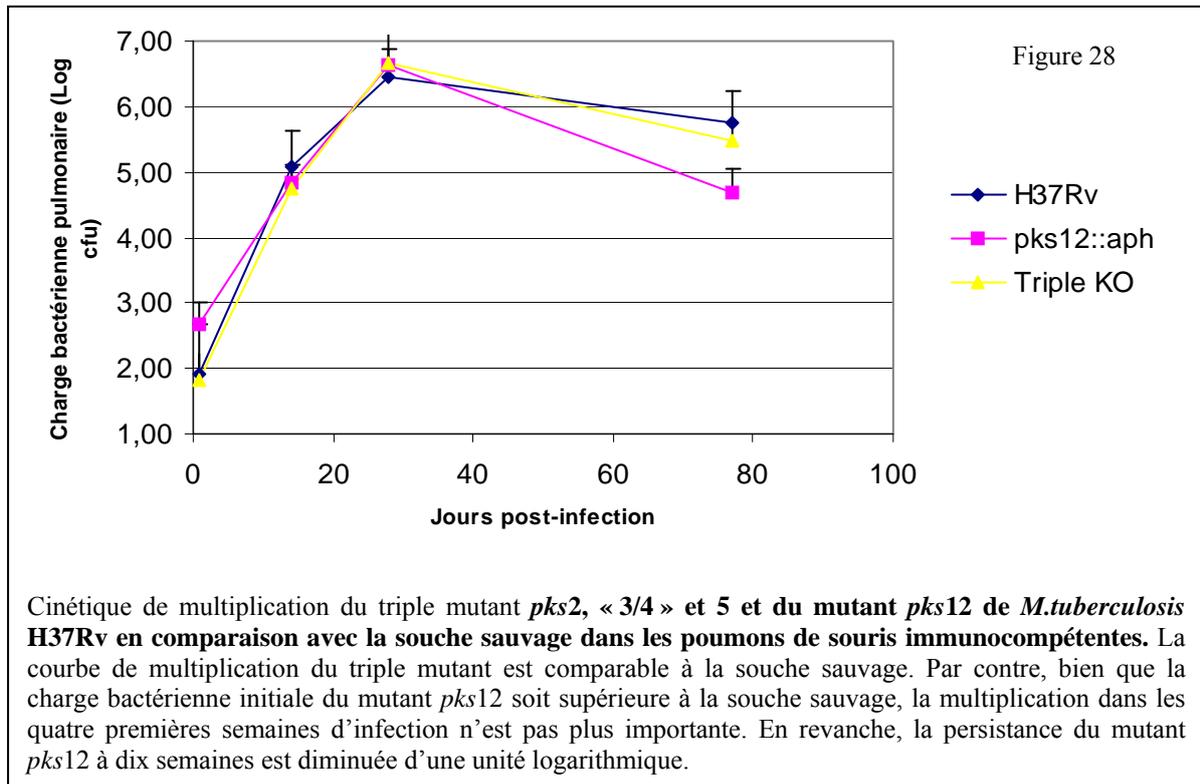
Pour l'étude des mutants *pks* de *M.tuberculosis*, l'infection et le maintien des souris nécessitent l'utilisation d'isolateurs sanitaires qui limite techniquement le nombre de souris pouvant être infectées. Pour cette raison, plusieurs cinétiques indépendantes ont dues être réalisées pour étudier la multiplication résiduelle des souches mutées. Une première étude nous a permis d'évaluer ce phénomène pour les mutants *pks 5* et *18* (Fig 29). Comme décrit précédemment, une faible charge initiale ( $10^2$  cfu) permet d'observer une multiplication

importante du bacille tuberculeux sauvage qui avoisine  $10^5$  bactéries deux semaines après l'infection. Cette multiplication continue dans une moindre mesure jusqu'à quatre semaines pour se stabiliser à un million de bactéries après dix semaines d'infection. Nos résultats montrent que l'inactivation de *pks5* ou de *pks18* n'altère en rien la capacité des mutants à proliférer dans les poumons des souris infectées. Contre toute attente, l'inactivation de *pks2* est également sans effet sur la multiplication des bactéries dans ce modèle. De même, aucun phénotype d'atténuation ou d'hyperprolifération n'est observé lors de l'étude du mutant *pks7*.



En absence de phénotype biochimique détectable, il pouvait être envisagé une compensation de l'inactivation d'une Pks par l'activité d'une autre. En particulier, les *mas*-like sont génétiquement proches et nous avons imaginé en l'occurrence que la perte fonctionnelle de Pks2 pouvait être compensée par l'activité compensatoire de Pks5. Une anticipation technique nous a permis de réaliser un double mutant *pks2/pks5* en appliquant les propriétés de la résolvasse du transposon  $\gamma\delta$  (Malaga *et al.*, 2003). La souche résolue du mutant *pks5* a pu être à nouveau transformée par l'AES de *pks2* en stratégie TS/*sacB*. L'interruption de *pks2* par l'*aph* aboutit à une souche considérée comme étant un triple mutant suite aux

observations de l'inactivation naturelle de *pks3/4* et l'inactivation avant résolution de *pks5*. Cette souche, dépourvue de phtiocéranates, de phtiénoates et du produit de Pks5, a été étudiée en parallèle du mutant *pks12* pour sa capacité résiduelle à se multiplier dans les poumons de souris immunocompétentes (Figure 28).



L'inactivation de *pks5* et de *pks2* dans une souche de *M.tuberculosis* H37Rv naturellement mutée pour *pks3/4* n'a pas permis de détecter de défaut de multiplication ou de persistance, dans les poumons des souris infectées. En revanche, l'inactivation de *pks12* dans *M.tuberculosis*, comme dans le cas de *M.bovis* BCG, altère la persistance de ce mutant dans les phases tardives de l'infection en modèle murin. Ce défaut de persistance a été observé dans deux expériences indépendantes. Le phénotype d'atténuation dans *M.bovis* BCG étant critiquable suite à l'observation de la perte d'une classe de PGL, nous avons généré un nouveau mutant *pks12* par la méthode de transduction phagique dans un isolat d'une souche sauvage du BCG produisant le PGL A. Le mutant est cette fois bien capable de produire les deux classes de molécules. La cinétique de persistance de ce mutant en modèle murin est en cours et constitue un objectif du stage de Leonardo ALPHONSA qui effectue un Master Recherche dans l'équipe.

### II.1.6) Discussion

Les résultats obtenus dans cette première partie ont permis d'évaluer dans le modèle souris, la contribution de la plupart des polykétides mycobactériens dans la multiplication et la persistance des bacilles du complexe tuberculosis. Pour ce faire, nous sommes parvenus à inactiver au moins un gène de chaque locus *pks* présents sur le chromosome de *M.tuberculosis* et de *M.bovis* BCG.

Il apparaît clairement que les outils utilisés dans cette étude pour inactiver les différentes polykétides synthases ciblées ne peuvent laisser présager le temps nécessaire à l'obtention d'un mutant. Curieusement, le gène *pks2* a été l'un des premiers mutants dont nous avons pu disposer et c'est également le premier mutant de polykétide synthase caractérisé chez *M.tuberculosis* par Sirakova *et al.* en 2001. Sans arguments rationnels, il semble que la nature du locus considéré pour l'échange allélique soit décisive sur la fréquence des événements de recombinaisons. Il était déjà établi que la longueur du fragment d'ADN pouvait favoriser cette fréquence (Balasubramanian *et al.*, 1996). Or toutes les AES construites pour cette approche systématique ont été réalisées selon le même schéma comportant approximativement un kilobase de part et d'autre de l'*aph*. Pourtant, la construction utilisée pour inactiver *pks7* a clairement montré un comportement différent pour la recombinaison entre H37Rv et BCG. Il est évident, au vu de ces résultats, que l'insertion par recombinaison homologue est dépendante de fluctuations statistiques que les outils utilisés ne peuvent contourner. La persévérance permet dans la majorité des cas, l'obtention de mutants par échange allélique en utilisant les vecteurs répliatifs ou suicides associés au marqueur de contre-sélection *sacB*. L'approche utilisant le phage thermosensible est indéniablement plus efficace en terme de fréquence de recombinaison homologue. Elle présente l'avantage de surpasser les problèmes d'efficacité de transformation des mycobactéries à croissance lente en utilisant un procédé naturel d'infection des mycobactéries. De plus, elle permet l'intégration de grands fragments d'ADN, facteur favorable à la recombinaison homologue chez les mycobactéries (Balasubramanian *et al.*, 1996). Ce succès reste toutefois très fortement nuancé par le temps élevé nécessaire à la construction des particules, contrairement aux clonages des AES en vecteur suicide ou thermosensible. De plus, la capacité d'encapsulation du phage  $\lambda$  limite la taille de l'AES à 4kb. Toutefois, la disponibilité de cette technique devrait faciliter à l'avenir l'inactivation par échange allélique en particulier dans le cas de *M.bovis* BCG.

La recherche des métabolites catalysés par les différentes polykétides synthases par une approche de criblage systématique du métabolome après radio-marquage sélectif n'a pas été fructueuse. Nous avons pu confirmer le rôle de Pks2 dans la biosynthèse du sulfolipide chez *M.tuberculosis*. L'absence de lipides anioniques purifiables pour ce mutant, confirmé par le marquage au  $^{35}\text{S-SO}_4^{2-}$  de Converse en 2003, indique vraisemblablement que la sulfatation du tréhalose et son acylation soient respectivement dépendante voire concomitante à la nature et au transfert des acides phtiocéraniques. En effet, ces auteurs ont pu montrer que la perte du transporteur Mmpl8 présent au locus de *pks2*, conduisait à l'accumulation d'un précurseur de tréhalose sulfate diacylé, notamment par une molécule d'hydroxyphthiocéranate. La biosynthèse des polykétides étant *a fortiori* cytoplasmique, le transfert des phtiocéranates supplémentaires pour obtenir le sulfolipide mature serait couplé au transport spécifique par Mmpl8 de la molécule synthétisée. Cette observation est d'autant plus cohérente que dans chaque locus *pks* de « mas-like » apparaît un transporteur qui lui est propre.

Par ailleurs, nous n'avons pas pu retrouver l'absence des acides phtienoïques estérifiés sur le tréhalose suite à l'inactivation de *pks3/4* d'H37Rv puisque la souche sauvage de *M.tuberculosis* utilisée pour cette étude présente naturellement un polymorphisme génétique qui scinde la Pks en deux polypeptides inactifs. L'implication de cette Pks dans la biosynthèse des acides phtienoïques n'est pas remise en question. Par contre, le fait qu'ils aient été décrits à l'origine comme étant spécifique des souches virulentes du complexe tuberculosis est désormais soumis à restriction. La souche atténuée de *M.bovis* BCG est décrite comme étant déficiente en phtienoates (Daffé *et al.*, 1983). Pourtant, l'analyse du génome de la souche parentale de *M.bovis* ne montre pas ce polymorphisme de *pks3/4*. Il serait intéressant d'étudier l'intégrité de ce locus pour déterminer l'origine de cette perte fonctionnelle chez *M.bovis* BCG.

En ce qui concerne l'analyse biochimique des autres mutants *pks*, nous sommes pour le moment, seulement à même de démentir certaines données publiées sans en apporter de nouvelles. En effet, l'arrêt de production de DIMs suite à l'inactivation des *pks7* et *pks12* n'est pas reproductible. Cet effet non spécifique a d'ailleurs été relevé dans une publication récente (Domenech *et al.*, 2004). Cette équipe a réalisé la même approche d'inactivation systématique de *pks* et relate l'avènement de la perte spontanée et non reproductible de la teneur en DIMs de certains de leur mutants. Par conséquent, il est probable que l'implication de *pks10* dans la biosynthèse des DIMs soit également un artéfact (Sirakova *et al.*, 2003a). La

perte des DIMs est à l'image de la perte des PGLs dans la plupart de nos mutants de *M. bovis* BCG. Cette observation soulève la réflexion du maintien de la production de facteurs de virulence dans des conditions non hostiles à la croissance. Dans un souci d'équilibre énergétique, la bactérie n'a pas d'intérêt à métaboliser des molécules inutiles. Le parasite obligatoire *Mycobacterium Leprae* illustre la perte de fonctions métaboliques que sa niche écologique lui fournit. La constatation d'une dégénérescence à l'extrême du génome du bacille de la lèpre a permis d'interpréter à la fois l'impossibilité de cultiver ce pathogène en laboratoire et ce parasitisme obligatoire (Cole *et al.*, 2001). Les passages répétés de la souche de laboratoire séquençée de *M. tuberculosis* pourrait être à l'origine de l'inactivation de certains gènes de *pks* qui ne confèrent pas d'avantage sélectif dans un milieu non hostile. L'inactivation constatée de *pks3/4* est finalement comparable à celle de *pks1/15* responsable de l'absence de production de PGLs toujours dans cette souche d'H37Rv Pasteur (Constant *et al.*, 2002). Cette souche de référence est donc au moins déficiente pour la production de deux dérivés de polykétides, les PGLs et les PATs. Ces dérives inhérentes à la manipulation des souches en laboratoire soulignent néanmoins la plasticité des génomes bactériens et les précautions à apporter dans l'analyse des données de séquence.

Dans ce contexte, il m'est donné de réfléchir sur l'intégrité du locus de *pks7* qui pourrait permettre d'expliquer l'absence de phénotype biochimique malgré nos efforts. Ce locus possède cinq gènes de polykétides synthases dont l'un présente une architecture non conventionnelle. Les gènes des *pks8* et *pks17* sont complémentaires fonctionnellement mais distincts génétiquement. Ce découplage génétique rappelle judicieusement l'inactivation fonctionnelle des Pks3/4 et Pks1/15 précédemment décrite. Les cinq gènes de *pks* de ce locus sont à mon sens, regroupés spatialement d'un point de vue génétique mais également fonctionnellement en terme catalytique, comme le sont les Pks modulaires décrits pour les *Streptomyces*. Par conséquent, l'inactivation d'un seul module suffit à altérer la biosynthèse du polykétide final. C'est d'ailleurs sur ce postulat que nous avons décidé de n'inactiver que *pks7* pour ce locus. Par conséquent, si une mutation ponctuelle est à l'origine de l'interruption de la Pks8/17 en deux polypeptides distincts, Pks8 et Pks17, la souche H37Rv de référence est peut être à nouveau biochimiquement déficiente pour le polykétide métabolisée par les Pks de ce locus. Il serait donc logique qu'aucune différence du métabolome lipidique n'ait pu être observée entre le mutant *pks7* de ce locus et la souche sauvage. Cette analyse est d'autant plus cohérente qu'aucun nucléotide n'est présent entre les gènes des Pks8 et 17 et qu'une seule insertion de nucléotide suffirait à rétablir un seul cadre de lecture pour ces gènes. De plus,

cette interruption intervient au sein du domaine ER identifié par Yadav *et al.* en 2003. Une perspective originale pour déterminer la fonction de ce locus pourrait consister en son extraction par digestion enzymatique du chromosome artificiel ayant servi pour le séquençage du génome d'H37Rv. Après clonage, le rétablissement par mutagenèse dirigée d'un seul cadre de lecture de *pks8/17* permettrait de transformer le vecteur résultant dans *M.smegmatis* et analyser les molécules néosynthétisés dont la caractérisation sera facilitée par un marquage au propionate. Il serait également intéressant de séquencer de nombreux isolats de *M.tuberculosis* pour chercher à caractériser ce polymorphisme. Cependant *M.bovis* présente également deux cadres de lecture pour *pks8/17*, *M.bovis* étant proposé pour avoir dérivé d'une souche ancestrale de *M.tuberculosis* (Brosch *et al.*, 2002), cela signifierait que cette mutation ait été acquise antérieurement à leur divergence phylogénétique. Par conséquent, la mise en évidence d'un seul cadre de lecture pour *pks8/17* doit être recherchée dans une souche ancestrale non délétée pour RD9, comme *M.canettii*.

Concernant le locus *pks16*, il semblerait que ce gène ne code pas une polykétide synthase conventionnelle. Elle est annotée de cette manière pour son homologie significative avec une peptide synthase impliqué dans la biosynthèse d'un antibiotique, la saframycine. Or sa séquence peptidique ne laisse prédire après analyse bioinformatique aucune similarité avec des domaines Pks connus (<http://linux1.nii.res.in/~pkfdb/DBASE/page.html>). Pourtant, ce gène est observable dans tout les génomes de *Corynebacterineae* disponibles. Cette conservation suggère une fonction importante qui contrarie l'hypothèse d'un pseudo-gène. De plus, son niveau transcriptionnel est augmenté significativement dans un modèle de carence nutritionnelle censé mimer la latence de *M.tuberculosis* (Betts *et al.*, 2002). Enfin, malgré de nombreuses tentatives, nous ne sommes jamais parvenus à inactiver son homologue chez *M.smegmatis*. Prises ensemble, ces observations soulignent l'importance de ce gène de polykétide synthase non conventionnel. Son étude fonctionnelle nécessite une approche plus spécifique qui consisterait en premier lieu, à mettre en évidence une quelconque fonctionnalité, modification post-traductionnelle par une PPTase, capacité à lier un dérivé acylé du coenzyme A ou de l'AMP (présence d'une signature d'un domaine de liaison à l'AMP <http://www.pasteur.fr>) ....

La recherche du métabolite de Pks5 soulève d'avantage un problème méthodologique et stratégique. En effet, l'absence de phénotype biochimique détectable pour ce mutant a également été souligné par une autre équipe de recherche (Rousseau *et al.*, 2003b). Pourtant,

ce gène semble fonctionnel et présente, *a posteriori*, une parfaite prédisposition au méthylmalonyl-coA pour la synthèse d'un acide gras méthyl-branché (Yadav *et al.*, 2003). La composition en lipides méthyl-branchés majoritaires a été bien caractérisée chez *M.tuberculosis* (Pour revue, Asselineau, 1982). L'acide tuberculostéarique est la seule espèce ne comportant qu'une seule ramification méthyl. Ce lipide est retrouvé dans de nombreuses espèces d'actinomycètes. Par conséquent, ce métabolite étant plus conservé que la présence génétique de *pks5*, on ne peut lui attribuer sa biosynthèse. De plus, il semble que la méthylation soit postérieure à son élongation suite au marquage de l'acide tuberculostéarique par un donneur de méthyl, la SAM ou S-Adénosyl Méthionine. Parmi les espèces moléculaires polyméthyl-ramifiées, on retrouve les phtiocéranates et hydroxyphtiocéranates métabolisés par Pks2 (Sirakova *et al.*, 2001), les acides mycosérosiques métabolisés par Mas (Rainwater and Kolattukudy, 1985) et les acides phtiénoïques métabolisés par Pks3/4 (Dubey *et al.*, 2002). Seuls subsistent les acides hydroxyphtiénoïques dont la voie métabolique n'a pu être caractérisée. Il paraît donc logique d'attribuer cette fonction à Pks5. Cette tentative d'attribution fonctionnelle a été rendue inextricable par la très faible proportion de ce lipide dans les dérivés du tréhalose qui le contiennent, et ce en particulier dans la souche d'H37Rv utilisée dans notre étude. La détection limite de ce composé en chromatographie gazeuse ne permet pas de conclure sur sa disparition dans le mutant *pks5*. Une analogie fonctionnelle avec les travaux sur Pks2 pourrait encourager l'inactivation d'un transporteur associé au locus *pks5*, communément à chaque locus de « *mas-like* », Mmpl12. L'inactivation de Mmpl8 pour Pks2 induit non seulement la disparition du sulfolipide des lipides extractibles mais également l'accumulation d'un intermédiaire de tréhalose sulfaté acylé. Dans le cas de Pks5, l'accumulation d'un tel précurseur pourrait nous renseigner sur le métabolite final dont Pks5 contribue à l'élaboration.

Pour finir, la fonction de Pks18 n'a également pas été attribuée lors de notre criblage. Une remarque qui pourrait être applicable à Pks5 repose sur le degré d'activité de ces enzymes dans nos conditions de culture. Aucune approche n'a été réalisée pour tenter de mettre en évidence ou d'estimer la présence de ces enzymes. Il est possible d'imaginer une régulation, du niveau transcriptionnel jusqu'aux modifications post-traductionnelles, qui permettrait d'expliquer une activité faible et non détectable de ces Pks dans nos conditions de culture expérimentales. Par ailleurs, il est également critiquable que nous nous soyons restreints aux molécules apolaires pour ce criblage. Cependant, les données *in vitro* sur l'activité de Pks18 montre une spécificité originale pour de longues chaînes grasses (C<sub>12</sub> à

C<sub>20</sub>) (Saxena *et al.*, 2003). Ceci conforte notre approche. Toutefois, le polykétide pyrone caractérisé (§1.4.2) rend perplexe quant à la fonction d'une telle molécule. Une hypothèse assez hasardeuse découle de la présence du gène Rv1373 annoté comme codant une glycolipide sulfotransférase, juxtaposé à celui de *pks18*. Ces deux gènes, ainsi qu'un troisième en amont de *pks18* codant une protéine membranaire conservée, semblent associés, tout du moins génétiquement, par leur transcription vraisemblable en opéron. Cette association hypothétique avec une sulfotransférase permet d'envisager l'engagement de Pks18 dans le métabolisme d'un glycolipide sulfaté, hypothèse qui pourrait être testée par incorporation différentielle de <sup>35</sup>S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> entre le mutant *pks18* et la souche sauvage. Parallèlement, un transfert de l'opéron dans un vecteur d'expression mycobactérien pour son expression hétérologue dans *M.smegmatis* pourrait pallier au problème putatif d'une régulation transcriptionnelle.

L'analyse du phénotype de virulence de nos mutants *pks* en modèle murin s'est heurtée au polymorphisme de certains loci. L'exemple frappant repose sur le gène de la Pks3/4. L'analyse préliminaire montrait une scission génétique entre les domaines KS et AT qui permettait de restituer deux polypeptides complémentaires fonctionnellement. La littérature relatait l'existence d'une telle Pks hybride entre le type I et le type II associant l'activité d'un domaine solitaire avec un module incomplet et codés par les gènes *MbtC* et *D* pour la biosynthèse d'un sidérophore de *M.tuberculosis*, la mycobactine (Quadri *et al.*, 1998). En l'absence des données génomiques de *M.bovis*, nous ne pouvions prévoir ce polymorphisme qui rend Pks3/4 non fonctionnel. Dans cette logique, il semble maintenant cohérent que nous n'ayons pu observer de différence de virulence pour le mutant *pks7*. Ce gène faisant partie du locus de *pks8/17* qui pour les raisons décrites précédemment, serait également inactive dans notre souche d'étude de *M.tuberculosis*, même si le polykétide synthétisé constituait un facteur de virulence, une double inactivation de sa voie métabolique serait forcément sans effet. Cette hypothèse, quelle que soit sa véracité, souligne le problème du polymorphisme dans l'évaluation d'un facteur de virulence. En effet, la souche Pasteur d'H37Rv utilisée dans notre étude ne produit pas de PATs. Pourtant une souche génétiquement proche, l'ATCC#25618 est affectée par la perte des PATs suite à l'inactivation de *pks3/4* (Dubey *et al.*, 2002). D'après ces auteurs, ce mutant agrège en solution quand notre souche se comporte normalement. L'absence de PATs dans notre souche d'étude doit être compensée par d'autres molécules. Par conséquent, il semble que le bacille tuberculeux selon les souches combine de multiples facteurs de virulence qui, de concert, permettent le maintien

de son intégrité et de son pouvoir pathogène. C'est dans cette optique que nous avons cherché à multiplier les mutations grâce au système résolvasse. De cette manière, nous espérons altérer cette combinaison et la mettre en évidence au moins pour les dérivés de polykétide synthase « Mas-like ». L'association de la perte fonctionnelle induite des Pks2 et 5 et naturelle pour les Pks1/15 et 3/4 dans une même souche n'affecte pas sa capacité à se multiplier en modèle murin. Malgré les activités conférées au sulfolipide *in vitro*, d'autres auteurs mentionnent également l'absence de phénotype dans un modèle cobaye, plus proche de l'homme en terme de réponse granulomateuse (Rousseau *et al.*, 2003c). Ces mêmes auteurs attribuent pourtant dans une autre étude, une différence de quasiment une unité logarithmique en phase tardive pour la multiplication d'un mutant *pks5* dans les poumons de souris (Rousseau *et al.*, 2003b). Or leur mutant provient à nouveau d'une souche de *M.tuberculosis* ATCC#25618. Ceci souligne à nouveau, l'importance du fond génétique et de cette combinaison des facteurs qui semblent être utilisés distinctement selon les souches pour leur pathogénicité. Dans le fond génétique de l'H37Rv Pasteur, les « mas-like » ne semblent pas prépondérantes pour la multiplication du bacille tuberculeux en modèle murin.

Par contre, l'interruption du gène *pks12* présente un effet notable sur la persistance des mutants, à la fois pour notre souche de *M.tuberculosis* mais également pour *M.bovis* BCG. Dans le mutant de BCG, la perte du PGL A influe certainement sur la persistance. En effet, si on compare la présence du PGL A à la persistance des mutants BCG, tous les mutants déficients sont altérés pour la persistance en phase tardive. D'ailleurs, l'implication du PGL dans la virulence de *M.tuberculosis* a récemment été reportée (Reed *et al.*, 2004). Cependant, l'inactivation de *pks12* amplifie clairement l'effet qui serait associé à la perte du PGL A. Dès la deuxième semaine qui suit l'infection, la charge bactérienne est nettement réduite quand les autres souches persistent encore. De plus, le mutant équivalent de *M.tuberculosis* H37Rv est également altéré dans sa persistance en phase tardive d'une unité logarithmique. L'interprétation de cette atténuation n'est pas assurée. Contrairement aux résultats de Sirakova *et al.* en 2003, elle ne serait pas due à une déficience en DIMs puisque notre souche les produit. Par contre, la caractérisation du produit de Pks12 comme étant la partie acylée d'un glycolipide mannosylé semble plus rationnelle (Matsunaga *et al.*, 2004). Pourtant le mycokétide correspondant est très minoritaire dans les extraits lipidiques. Bien que corrélant avec l'absence de détection de cette molécule dans notre criblage, ce mycokétide semble d'avantage correspondre à un intermédiaire de biosynthèse, en constituant par exemple, un donneur de mannose ou à l'inverse, un accepteur de motifs saccharidiques plus complexes.

De plus, ces auteurs ont réussi à caractériser ce métabolite par une approche très spécifique de ligand de CD1, molécule présentatrice d'antigènes. Or, ce lipide serait présenté par une molécule de CD1c humaine, sous-groupe qui n'existe pas chez les rongeurs (Pour revue, Moody and Besra, 2001). Pourtant, il semble évident que dans le processus infectieux humain, ce mycokétide soit spécifiquement présenté à des lymphocytes T signalant la présence de mycobactéries intra-cellulaires. Les découvreurs de ce mycokétide soulignent d'ailleurs la conservation de *pks12* dans les mycobactéries d'importance médicale, et notamment l'activité du mycokétide dans le pouvoir vaccinant de *M.bovis* BCG. En l'absence de molécules présentatrices spécifiques chez la souris, l'absence de cette réponse à médiation cellulaire ne peut être à l'origine du phénotype d'atténuation. Qui plus est, ce type d'induction immunologique n'est théoriquement pas favorable pour le pathogène, et la conservation de ce glycolipide sous-entend certainement une fonction plus importante, responsable du phénotype murin. Or une hypothèse émise précédemment dans ce manuscrit impliquerait ce mycokétide dans la biosynthèse du LAM. La présence de *ppm1* juxtaposé sur le locus dont l'inactivation induit l'absence de LAM-like dans une souche de Corynébactérie, en est un indicateur. Une analyse préliminaire de notre mutant ne montre pas d'absence globale de LAM après purification. Toutefois, le LAM est une molécule très hétérogène ; il nous est impossible de déterminer pour le moment, si des modifications fines sont advenues sur les coiffes mannose par exemple. Une analyse plus fine est en cours.

Pour terminer, l'interruption de *pks18* ne conduit pas à une modification détectable du phénotype de virulence en modèle murin. Toutefois, il est notable que lors de l'étude de la persistance du mutant correspondant de *M.bovis* BCG, la charge bactérienne semblait plus stable dans les phases tardives de l'infection que pour la souche sauvage. Cette observation est en accord avec des résultats communiqués par C.Barry III<sup>rd</sup> indiquant un phénotype d'hypervirulence d'un mutant *pks18* de *M.tuberculosis*. Cependant, la souche sauvage utilisée dans notre étude s'est avérée être constituée d'un mélange de bactéries produisant ou non le PGL A, en proportion respective 80/20. Par conséquent, il est difficile de déterminer l'effet de cette proportion de bactéries variantes dans l'inoculum sur la persistance tardive de la souche sauvage. Une cinétique en cours, incluant un isolat de *M.bovis* BCG non altéré pour la production de PGLs, devrait nous permettre de trancher.



## II.2) Approche ciblée d'un locus Pks conservée chez les *Corynebacterineae*

### II.2.1) Caractérisation de Pks13 comme la condensase des acides mycoliques ( 1<sup>er</sup> article)

La production d'acides mycoliques est une particularité taxonomique du sous-ordre des *Corynebacterineae*. Ces acides gras particuliers sont composés schématiquement d'une chaîne grasse acylée sur le carbone alpha et hydroxylée sur le carbone bêta. Ce motif mycolique requiert une activité de condensation effectuée classiquement lors de la biosynthèse de lipides ou de polykétides suite à l'activité catalytique d'un domaine kétosynthase. La conservation de ce motif nécessite la présence d'une condensase ubiquitaire aux bactéries productrices d'acides mycoliques. Le métabolisme des mycolates est déjà la cible d'un antituberculeux de première ligne, l'isoniazide. La mise en évidence de la condensase des acides mycoliques constituerait la caractérisation d'une cible de choix pour la recherche de nouveaux antituberculeux, dans le contexte de l'apparition de souches résistantes à ces antibiotiques. La comparaison des génomes permet l'approche rationnelle de voies métaboliques conservées. Notre analyse bioinformatique révèle la présence d'un locus conservés chez toutes les *Corynebacterineae* séquencées, qui comprend un gène de polykétide synthase, annoté *pks13* chez *M.tuberculosis*. Comme la production de mycolates est essentielle à la survie des mycobactéries, nous avons entrepris l'inactivation de *pks13* dans une corynebactérie. Nous avons supposé que dans cette famille, la production de mycolates n'était pas essentielle, suite à la caractérisation d'un représentant dépourvu de mycolates, *C.amycolatum*. L'interruption de *pks13* dans *Corynebacterium glutamicum* induit un profond remaniement structural de l'enveloppe bactérienne indiqué par la perte d'un plan de cryofracture en microscopie électronique. L'analyse de sa composition lipidique montre l'absence de mycolates suite à l'interruption de *pks13* malgré la persistance de précurseurs nécessaires à l'étape de condensation. L'établissement d'un mutant conditionnel thermosensible de *pks13* dans *M.smegmatis* indique l'essentialité de Pks13 pour la croissance de cette mycobactérie à température non permissive. Un marquage métabolique montre une diminution de la biosynthèse des acides mycoliques qui corrèle à la perte de viabilité du mutant conditionnel. Ces résultats nous permettent de valider l'implication de Pks13 dans la dernière étape de condensation du métabolisme des acides mycoliques. L'essentialité de cette étape enzymatique pour la croissance des mycobactéries en fait une cible idéale pour la recherche et le développement de nouveaux antituberculeux.



## II.2.2) L'activation des substrats pour la condensation des acides mycoliques (2<sup>ème</sup> article)

Nous avons précédemment démontré l'implication de Pks13 dans la dernière étape de condensation des acides mycoliques. L'analyse génétique de son locus laisse apparaître une transcription en opéron avec deux gènes codant théoriquement une acyl-coA synthase (FadD32) et une sous-unité d'une acyl-coA carboxylase (AccD4). Nous avons proposé que la présence de ces enzymes était en adéquation avec la fonctionnalisation de précurseurs nécessaires à la condensase. La réaction de condensation réalisée par Pks13 nécessite d'une part, l'activation de la chaîne méromycolique en un dérivé thioester activé et d'autre part la transformation de la chaîne alpha en acyl-malonyl par une carboxylase avant son transfert sur le domaine ACP de Pks13. Des résultats concomittents suite à l'étude systématique des FadD de *M.tuberculosis* ont montré une activité originale de certaines de ces protéines - dont FadD32 - d'acyl-AMP ligase. Ainsi FadD32 métaboliserait la future chaîne méromycolique des mycolates en un acyl-adenylate pour son transfert sur Pks13. Nous montrons que comme lors de l'inactivation de *pks13*, l'inactivation de *fadD32* comme *accD4* dans *C.glutamicum* bouleverse radicalement la morphologie des colonies. L'absence de production d'acides mycoliques analysée dans le mutant *fadD32* démontre l'implication fonctionnelle de FadD32 dans l'activation d'un acyl-AMP nécessaire à l'activité de la condensase. Le mutant *accD4* est également déficient pour la production d'acides mycoliques. L'absence d'AccD4 dans cette souche provoque également la disparition de précurseurs d'acyl-malonyl détectable par GC-MS dans la souche sauvage et qui s'accumulent dans le mutant *fadD32*. Ces résultats démontrent l'activité d'AccD4 pour la carboxylation de précurseurs nécessaires à l'étape de condensation des acides mycoliques. Cette étape de carboxylation nécessite l'intervention d'une sous-unité biotinylée pour la fixation du CO<sub>2</sub> à incorporer. La construction d'une souche mutée d'*accD4* de *M.smegmatis* et complémentée par une copie fonctionnelle étiquetée nous a permis de co-immunoprécipiter AccD4 avec les homologues d'AccA3 (sous-unité biotinylée) et AccD5 de *M.tuberculosis* après identification par protéomique. Ces résultats nous permettent de reconstituer le scénario et d'identifier les acteurs nécessaires pour la condensation des acides mycoliques. La construction de mutants conditionnels nous a permis de démontrer l'essentialité d'AccD4 et FadD32 pour la croissance des mycobactéries. Ces protéines, avec Pks13, constituent des cibles pharmacologiques privilégiées pour la recherche de nouveaux antituberculeux.



### III) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le projet développé dans cette étude a été initié dans un cadre particulièrement compétitif. L'activité des dérivés de polykétides en général et la présence de 24 gènes de polykétides synthases dans le génome de *M.tuberculosis* rendait l'étude des polykétides mycobactériens attractive. La survenue systématique de leur implication dans la virulence de *M.tuberculosis* lors de recherche globale de souches atténuées par mutagénèse aléatoire soulignait cet intérêt (Camacho *et al.*, 1999; Cox *et al.*, 1999). Historiquement l'équipe du D<sup>r</sup> Kolattukudy avait amorcé l'étude des polykétides mycobactériens en caractérisant les Pks du locus *mas* (Mathur and Kolattukudy, 1992). Cette anticipation lui permit de caractériser en premier lieu Pks2 dans la voie métabolique d'un lipide controversé de longue date pour son implication dans la pathogénie de *M.tuberculosis*, le sulfolipide I (Goren *et al.*, 1974b; Sirakova *et al.*, 2001). C'est à ce même moment que s'initiait mon projet de thèse. Alors que nous nous efforcions de construire un à un chaque mutant, l'entrée d'une autre équipe américaine dans le domaine souligna notre retard sur un aspect du projet. L'équipe du D<sup>r</sup> C.BarryIII<sup>rd</sup> avait réalisé la même approche systématique d'inactivation des Pks de *M.tuberculosis* et annonçait des cinétiques de survie en modèle murin de 300 jours. Finalement, cette compétition s'avéra complémentaire et fructueuse pour notre étude. Alors que nous étions sur le point de démontrer l'essentialité de Pks13 dans *M.smegmatis*, C.BarryIII<sup>rd</sup> confirmait l'impossibilité, malgré leurs efforts, d'inactiver *pks13* dans *M.tuberculosis*. A l'inverse, il communiquait l'étude d'une souche hypervirulente HN878 en comparaison à la souche de référence H37Rv, et associait cette différence phénotypique à la production de phénoglycolipides, au moment même où la publication du polymorphisme génétique de *pks1/15* dans l'équipe leur permettait d'interpréter génétiquement ce phénotype (Constant *et al.*, 2002). Par ailleurs, si les résultats contradictoires sur l'implication de Pks12 dans la biosynthèse des DIMs d'une part (Sirakova *et al.*, 2003b), et du mycokétide d'autre part, (Matsunaga *et al.*, 2004) n'avait pas été confirmé comme une disparition artéfactuelle des DIMs suite à nos résultats, la fonction de Pks12 resterait sujet à controverse. Enfin, sans les résultats de l'équipe du D<sup>r</sup> Kolattukudy sur l'implication de Pks3/4 dans la biosynthèse des phtiénoates, il n'était pas évident d'interpréter son inactivation naturelle dans notre souche d'étude. Dans le même raisonnement, ces polymorphismes des Pks1/15 et 3/4 nous ont amené à réfléchir sur l'intégrité du locus de Pks7 et de supposer une inactivation fonctionnelle de la Pks 8/17.

En absence de données métaboliques pertinentes, le locus *pks7* est particulièrement riche de perspectives. Regroupant cinq gènes *pks* dont deux chalcones synthases, il s'étend sur plus de 18 kilobases du génome de *M.tuberculosis*. Cela représente un investissement énergétique considérable qui sous-tend une fonction importante de cette voie métabolique. Dans l'hypothèse de l'intégrité de Pks8/17 dans des souches ancestrales, il pourrait être envisagé une fonction antérieure au changement évolutif de la niche écologique de *M.tuberculosis*, du sol à l'Homme. Dans l'environnement hostile et pauvre du sol, la biosynthèse d'antibiotiques conférerait un avantage sélectif pour la croissance. Cette hypothèse rejoint les théories élaborées sur le rôle des polykétides chez les *Streptomyces*. Il serait séduisant que la découverte du polykétide métabolisé par les Pks de ce locus d'une mycobactérie pathogène fournisse paradoxalement une molécule utilisable en pharmacologie, comme un nouvel antibiotique.

Concernant le rôle des polykétides mycobactériens dans la virulence de *M.tuberculosis* :

- Nous confirmons que le sulfolipide n'est pas déterminant pour la pathogénèse en modèle murin (Publié par, Rousseau *et al.*, 2003c). Une contribution dans la pathogénèse humaine ne peut cependant être écartée. Cette limite d'interprétation est inhérente au modèle d'étude. La démonstration que deux dérivés de polykétides produits respectivement par Pks2 et Pks12 seraient présentés comme des antigènes par des molécules de CD1 du groupe 1 soulignent l'importance de ces molécules dans l'immuno-pathologie de *M.tuberculosis* (Gilleron *et al.*, 2004; Matsunaga *et al.*, 2004). Or les CD1 du groupe 1 sont absentes chez le rat et la souris (Pour revue, Moody and Besra, 2001). Il serait donc intéressant de rechercher la présence de ces molécules présentatrices d'antigènes dans d'autres modèles animaux comme le lapin, pour étudier le phénotype de virulence des mutants *pks2* et *pks12*.

- Nous nous sommes limités à l'observation de la multiplication et de la persistance de nos mutants. Or l'atténuation de la virulence de *M.tuberculosis* ne peut se restreindre à cette approche. En effet, une différence en terme de survie du modèle peut être observée alors que les souches utilisées pour l'infection se multiplient en apparence de manière identique (Reed *et al.*, 2004). Au-delà de cette limite, nous sommes en mesure de conclure sur l'importance de l'activité de Pks12 dans la persistance de *M.tuberculosis* en modèle murin malgré l'absence de CD1c. Ce résultat étend la fonction du dérivé de polykétide produit par Pks12 d'un simple antigène à un potentiel facteur de virulence. En parallèle d'une recherche de l'implication du mycokétide métabolisé par Pks12 dans la biosynthèse de composés mannosylés, un projet

initié dans l'équipe par la D<sup>r</sup> Astarie-Dequeker repose sur l'étude de ce mutant dans sa capacité à se multiplier et induire la sécrétion de cytokines en modèle macrophage humain. Ces données pourraient permettre de déterminer une implication du facteur de virulence associé à l'activité du mycokétide dans l'immuno-régulation nécessaire à la pathogénicité du bacille tuberculeux.

Dans la seconde partie de ce projet, nos résultats ont permis de caractériser les acteurs d'une étape de la biosynthèse des acides mycoliques ayant suscité un grand nombre de travaux ces quarante dernières années, l'étape de condensation. Cette découverte constitue non seulement une avancée importante dans la compréhension fondamentale du métabolisme des acides mycoliques mais également la caractérisation de cibles réellement attractives pour le développement de nouveaux antituberculeux. Cette découverte a d'ailleurs été considérée comme une invention et a fait l'objet d'un dépôt de brevet par le CNRS (Annexe 2). En effet, la découverte ou la conception d'inhibiteurs d'une polykétide synthase n'a en théorie pas de raisons d'interférer avec une voie métabolique humaine puisque ces enzymes sont restreintes aux bactéries et aux champignons. D'un point de vue fondamental, cette activité de condensation réunit les substrats les plus longs qu'il ait été décrit pour une polykétide synthase. L'originalité de cette activité reflète celle du motif structural de ces acides gras pouvant atteindre 90 atomes de carbone. Cette particularité relève des enjeux majeurs pour les perspectives qui découlent de ce travail. La recherche d'inhibiteurs spécifiques peut être envisagée selon deux axes principaux, le criblage ou la conception rationnelle. Pour leur criblage, la mise en place de tests d'activités à partir de protéines purifiées n'est pas triviale. Les polykétides synthases nécessitent d'une part d'être modifiées post-traductionnellement par un groupement prosthétique phosphopantéthéinyl qui nécessitent des systèmes d'expression hétérologue élaborés coexprimant une PPTase (Gokhale *et al.*, 1999; Weissman *et al.*, 2004). De plus, l'essentialité de protéines associées comme FadD32 sous-entend que Pks13 pourrait ne pas être capable de prendre en charge, seule, le précurseur d'acyl-AMP. En effet, malgré la présence de 36 gènes *fadD* dans le génome de *M.tuberculosis*, il n'y a pas de redondance fonctionnelle entre ces protéines mais au contraire une spécificité d'interaction fonctionnelle au moins pour celles associées aux Pks (Trivedi *et al.*, 2004). Toutefois, la carence d'informations précises concernant le génome de *M.smegmatis* empêche de prédire si l'essentialité de FadD32 dans cette espèce n'est pas due à l'absence de cette redondance. En tout cas, l'inactivation de *fadD26* (Camacho *et al.*, 1999) ou de *fadD28* (Cox *et al.*, 1999; Fitzmaurice and Kolattukudy, 1998) a conduit dans les deux cas à la perte des DIMs montrant

l'absence d'une redondance fonctionnelle pour ces deux protéines. Cette spécificité FadD/Pks dans la mise au point de tests d'activité de Pks13 pourra nécessiter la présence des deux protéines pour fonctionnaliser l'essai. Un obstacle supplémentaire provient encore de l'originalité des substrats qui risquent par leur nature de poser des problèmes de solubilité. Enfin, il manque malgré tout une pierre pour terminer l'édifice de cette étape de condensation qui repose sur la nécessité de réduire le  $\beta$  céto-ester formé par Pks13 pour former l'acide mycolique mature. Pour le moment, nous ne sommes pas en mesure de déterminer si cette activité de réductase n'est pas antérieure et nécessaire au relargage du produit de condensation de Pks13. Une approche de co-immunoprécipitation de Pks13 comparable aux expériences réalisées pour l'identification des partenaires d'AccD4 est en cours. Quoiqu'il en soit, ces perspectives sont d'actualité puisqu'elles concernent directement Benoit VanDerRest dans le cadre d'un projet post-doctoral initié sur l'institut récemment dans l'équipe de Mamadou DAFPE.

L'approche rationnelle pour la conception d'inhibiteurs serait grandement favorisée par l'obtention de données structurales tridimensionnelles de ces protéines responsables de la condensation des acides mycoliques. Le poids moléculaire de Pks13 ne permet pas une approche de détermination structurale par RMN. Par contre, bien que représentant un réel défi, ce projet peut être réalisé et, a été également initié dans l'institut par une approche cristallographique dans l'équipe du Dr Lionel MOUREY. Le clonage et les conditions de surexpression de Pks13 réalisés par Wladimir MALAGA dans l'équipe ont permis d'obtenir des quantités de protéines pures en adéquation avec cette approche. Une stratégie complémentaire et plus raisonnable repose sur la détermination des domaines indépendants de Pks13. La co-cristallisation ou la diffusion des substrats ou produits de la condensase permettrait le cas échéant de déterminer les interactions protéines-ligands essentielles pour la conception d'inhibiteurs assistée par ordinateur.

L'inhibition de cette étape métabolique pourrait permettre non seulement d'ajouter une substance à la pharmacopée des anti-tuberculeux mais pourrait constituer également un antibiotique à spectre élargi aux mycobactéries en général.

Plus qu'une cible thérapeutique, Pks 13 constitue un outil supplémentaire pour étudier et comprendre le métabolisme unique de ce lipide chez les mycobactéries. Une question non résolue repose sur la localisation de cette étape de condensation des acides mycoliques. A

*priori*, il serait logique qu'elle se situe dans le cytoplasme de la bactérie. En effet, la nécessité de co-facteur précieux comme l'ATP, ne permet pas de concevoir leur utilisation dans le milieu extra-cellulaire. Le cas échéant, ces acides gras particulièrement encombrants devraient traverser la membrane plasmique, le peptidoglycane et l'arabino-galactane pour atteindre leur site d'estérification. Un assemblage sur place semblerait plus cohérent. Pour résoudre cette énigme, il serait possible d'envisager d'étudier la localisation de Pks13 et de ses partenaires par immuno-cytochimie couplée à la microscopie électronique. De manière comparable aux expériences d'immunoprécipitations réalisées sur AccD4 et FadD32 étiquetées *c-myc*, nous avons construit une souche mutante dans le gène *pks13* de *M.smegmatis* après complémentation par une copie fonctionnelle de Pks13 étiquetée, cette fois par l'épitope HA du virus de la grippe. Ces trois souches pourraient permettre de réaliser des expériences de co-localisation des différents partenaires et de déterminer les sites où se déroulent cette étape de condensation des acides mycoliques. La biosynthèse des acides mycoliques est directement liée à la croissance des mycobactéries. Nous avons pu l'observer par une diminution progressive de l'incorporation de précurseurs radio-actifs de la phase exponentielle de croissance à la saturation d'une culture de *M.smegmatis*. Ainsi il ne serait pas surprenant de localiser cette biosynthèse à des sites d'expansion de la bactérie en croissance, comme la zone de septation par exemple.

Pour conclure, il me semble important de réfléchir sur le rôle de la recherche dans les infections mycobactériennes. L'infection par *M.tuberculosis* et les épidémies de tuberculose sont étroitement liées aux conditions de vie des populations touchées. Ainsi tant que la pauvreté existera, il semble que *M.tuberculosis* perdurera<sup>(1)</sup>. Ces considérations socio-économiques ajoutent une notion d'humanisme motivante à l'investissement de sa recherche dans la lutte contre la tuberculose. Le Dr Brennan, lors d'un séminaire sur l'institut énonça cette maxime ironisant l'état de cette recherche : « *So much targets, so few drugs* ». Aujourd'hui l'identification de la condensase est à l'origine de nombreux efforts pour tenter de valoriser cette cible et je suis heureux d'avoir pu participer à l'élaboration de ce travail.

(1) « *The poor will remain a breeding ground for the « white plague » until we realize that it is not only the microbe Mycobacterium tuberculosis that is causing the disease, but also the abominable conditions under which hundreds of millions of people on this planet are forced to live.* » (Paul D. van Helden, Science, 2003)



## IV) MATERIELS ET METHODES

### Cultures bactériennes :

- Escherichia Coli : Les différentes souches utilisées pendant ce travail sont par ordre d'importance JM109, X11, C600, Top10, MC1061 et DH5 $\alpha$ . Quel que soit la souche, ces bactéries ont été cultivées en milieu Luria Broth (LB) sous agitation pour les cultures liquides ou additionné d'agar 1.2% pour le réisolement en milieu solide. Les cultures sont effectués à 37°C supplémentées au besoin des antibiotiques suivants : Ampiciline à 100  $\mu\text{g/ml}$ , Hygromycine (Hyg) à 200  $\mu\text{g/ml}$ , Kanamycine (Km) à 40  $\mu\text{g/ml}$ , Gentamycine (Gm) à 15  $\mu\text{g/ml}$ , Streptomycine (Str) à 25  $\mu\text{g/ml}$  et Chloramphénicol (Clm) à 30  $\mu\text{g/ml}$ .
- Corynébactéries : La souche ATCC 13032 Res et ses dérivés ont été cultivés en milieu BHI (Brain Heart Infusion) liquide + Tween 0,05% sous agitation et à 32°C. Pour les réisolements, l'ajout de 1,5% d'agar constitue un milieu solide adéquat. La kanamycine est ajouté au besoin à 25  $\mu\text{g/ml}$  et le chloramphénicol à 15 $\mu\text{g/ml}$ .
- Mycobactéries : La souche non pathogène de référence, *M.smegmatis* (mc<sup>2</sup>155), la souche vaccinale de *M.bovis* BCG et les souches pathogènes de *M.tuberculosis* (H37Rv ; Erdman, ATCC27294) ont été cultivés principalement en 7H9 supplémenté en ADC (Albumine/Dextrose/Catalase) comme milieu liquide et au besoin en Tween 80 à 0,05% final pour prévenir l'agrégation des bactéries. Le milieu solide utilisé pour *M.smegmatis* est le LB-agar et le 7H11-agar supplémenté en OADC (Oléique/Albumine/Dextrose/Catalase) pour *M.bovis* BCG et *M.tuberculosis*. Les antibiotiques classiquement ajoutés sont Hyg à 50  $\mu\text{g/ml}$  ; Km : 40  $\mu\text{g/ml}$  et Str : 25  $\mu\text{g/ml}$ . Les temps de génération de *M.bovis* BCG et *M.tuberculosis* nécessite des temps de culture particulièrement élevé et sont donc cultivées dans des flasques laissant au moins 5 fois le volume de la culture en air.

### Transformations bactériennes :

- Escherichia Coli :

Pour la transformation chimique en chlorure de calcium, ensemercer 50 ml de LB au 1/100<sup>ème</sup> à partir d'une pré-culture saturée d'*E.coli* sous agitation à 37°C. Quand la culture atteint une DO à 600 nm comprise entre 0,3 et 0,4, transférer la culture dans un tube stérile de centrifugation et laisser 10 min sur glace. Le reste des manipulations seront strictement réalisées à 4°C avec du matériel préalablement réfrigéré. Après centrifugation 10 min à 4000rpm, les bactéries sont vigoureusement resuspendues dans 25 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M et laissées 30 min sur glace. A nouveau culottées, les bactéries sont reprises dans 2ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1M / glycérol 10% puis aliquotées par 200  $\mu\text{l}$  en Eppendorfs, congelées par une brève immersion en azote liquide et conservées à -80°C. La transformation se fait par homogénéisation douce de quelques  $\mu\text{l}$  d'ADN avec les bactéries. Après 15 min sur glace, on réalise un choc thermique par un bain de 90 sec à 42°C puis de 2min sur glace. Enfin, l'expression phénotypique est réalisé par ajout de 800  $\mu\text{l}$  de LB et incubation d'une heure à 37°C sous agitation en tube coiffé. Les transformants sont sélectionnés sur milieu solide à 37°C après dilution adéquate.

Pour la transformation électrique, les bactéries sontensemencées comme précédemment. A  $DO^{600nm}$  de 0.4 maximum, transférer la culture dans un tube stérile de centrifugation et laisser 30 min sur glace. Après centrifugation, le culot bactérien est lavé par 40ml d'eau stérile à 4°C par trois fois au total. Au final, les bactéries sont reprises dans 2 ml de glycérol 10% stérile à 4°C et aliquotées par 100  $\mu$ l en Eppendorfs pour la congélation rapide en azote liquide puis la conservation à -80°C. Pour la transformation, refroidir une cuvette d'électroporation contenant quelques  $\mu$ l d'ADN dans la glace pendant que l'aliquot de bactérie y décongèle lentement puis ajouter les bactéries sur l'ADN et électroporer à 2,5 kV (25 $\mu$ F, 200 $\Omega$ ). Dans ces conditions, la constante de temps doit égalier 4,5ms pour un électroporateur « BioRad ». Enfin, l'expression phénotypique est réalisé par ajout de 800  $\mu$ l de LB, transfert en tube coiffé et incubation une heure à 37°C sous agitation. Les transformants sont sélectionnés sur milieu solide à 37°C à la dilution adéquate.

- *M.smegmatis* :

A partir d'une pré-culture saturée en 7H9/ADC/Tween,ensemencer 50 ml de ce même milieu au 1/400<sup>ème</sup> et incuber sur la nuit, environ 15h, sous agitation à 37°C pour atteindre une  $DO^{600nm}$  de 0.4 à 0.6 maximum. Placer la culture sur glace pendant 30 min, après centrifugation réaliser deux lavages successifs du culot bactérien par de l'eau glacée contenant 0.05% de Tween80. A l'issu des lavages, les bactéries sont reprises par 1ml de glycérol 15% et aliquotées par 150  $\mu$ l en Eppendorfs pour la congélation rapide en azote liquide puis la conservation à -80°C. Pour la transformation, refroidir une cuvette d'électroporation contenant quelques  $\mu$ l d'ADN dans la glace pendant que l'aliquot de bactérie y décongèle lentement puis ajouter les bactéries sur l'ADN et électroporer à 2,5 kV (25 $\mu$ F, 200 $\Omega$ ). Dans ces conditions, la constante de temps doit égalier 4,5ms. Enfin, l'expression phénotypique est réalisé par ajout de 5ml de 7H9/ADC/Tween et incubation trois heures à 37°C sous agitation. Les transformants sont sélectionnés sur milieu solide à 37°C à la dilution adéquate.

- *M.bovis* BCG et *M.tuberculosis* :

Le protocole diffère de celui utilisée pour *M.smegmatis* en cela que le temps de génération est sept fois plus élevé. Par conséquent, la culture initiale est, elle,ensemencée au 1/100<sup>ème</sup> est placée 9 jours à 37°C. Puis on ajoute une solution de glycine 2M pour atteindre 1,5% final et on place à nouveau la culture 24h à 37°C. Ensuite, les cellules sont préparées comme pour *M.smegmatis* en omettant l'incubation de 30 min sur glace et en utilisant de l'eau à température ambiante pour les lavages.

#### Transduction par mycobactériophage recombinant de mycobactérie à croissance lente :

Préparer une culture de *M.bovis* BCG ou *M.tuberculosis* en 7H9/ADC/Tween80 à  $DO^{600nm}$  de 0,8~1, compter 10 à 12 jours de culture à 37°C pour un ensemencement au 1/100<sup>ème</sup> d'une pré-culture saturée. Pour chaque transduction, 10 ml de cette culture sont requis. Centrifuger ces 10 ml et les reprendre en 7H9/ADC dépourvu de Tween80 et incuber 24h à 37°C. Culotter à nouveau les bactéries pour les resuspendre dans 1ml de 7H9/ADC à 37°C, ajouter 1ml de phages thermosensibles concentré (10<sup>11</sup> particules phagiques/ml soit MOI $\approx$ 10) et incuber ce mélange à température non permissive (37°C) pendant 3h. A l'issu de l'infection, ajouter 50 ml de 7H9/ADC/Tween à 37°C et incuber 24h à 37°C. Après centrifugation, les bactéries sont resuspendues dans 1 ml de PBS-Tween 0,05%. La totalité

des bactéries est étalée sur 5 boîtes de 7H11 contenant l'antibiotique sélectif de l'insertion illégitime ou par recombinaison homologue de l'ADN d'origine phagique.

#### Préparation des cellules pour les infections murines ou leur phagocytose :

A partir d'une pré-culture saturée de la souche d'intérêt, ensemencer au 1/100<sup>ème</sup> 50ml de 7H9/ADC sans Tween80 et laisser 10 jours à 37°C (fin de phase exponentielle). Centrifuger la culture et ajouter une dizaine de billes de verre stériles de 3mm de diamètre et désagréger les bactéries en agitant manuellement vigoureusement pendant 1min. Resuspendre les bactéries dans 6ml de PBS stérile et laisser sédimenter les plus gros agrégats pendant 10min à température ambiante. Le surnageant est transféré pour être centrifugé 10 min à 1400 rpm. Le nouveau surnageant contenant principalement des bactéries désagrégées est transféré dans un nouveau tube pour y ajouter un volume de glycérol stérile pour atteindre 5% final et aliquoter la suspension bactérienne par 500 µl qui sera ensuite congelée à -80°C puis titrée par dilution/étalement.

#### Infection et titration de la charge bactérienne des poumons de souris :

Les souris sont infectées par voie intra-nasale sous anesthésie générale sans dépression respiratoire (Valium/Atropine/Imalgène). En position dorsale, 20µl d'une suspension de bactéries désagrégées leur est progressivement présentée à l'aide d'une micropipette sous forme de gouttelettes que l'inspiration naturelle des souris provoque leur inhalation. Les souris d'un même groupe sont différenciées par poinçonnage distinctif à l'oreille puis placées dans la même cage. La charge bactérienne inhalée diffère selon l'espèce de mycobactéries étudiée. Pour les souches dérivées de *M.bovis* BCG, la charge bactérienne inhalée avoisine les 10<sup>6</sup> bactéries pour permettre l'observation d'une cinétique de décroissance ou de persistance de la charge bactérienne aux jours 14, 28 et 70 post-infection. Pour les souches dérivées de *M.tuberculosis*, cent à mille bacilles sont présentés pour cette fois permettre d'observer une augmentation de la charge bactérienne tout au long de la cinétique.

La titration est réalisée uniquement pour les poumons et la rate. Pour ce faire, les souris sont décérébrées puis immédiatement disséquées, les organes d'intérêt sont transférés en tubes stériles pour le transport jusqu'au lieu de broyage, en P2 pour *M.bovis* BCG et P3 pour *M.tuberculosis*. Les organes sont à nouveau transférés dans des pots de broyage de 2cm<sup>3</sup> et succinctement broyés à sec. Puis on ajoute 2ml de PBS-tween 0,05% stérile au broyat que l'on affine jusqu'à l'obtention d'une suspension bien homogène. Le broyat est transféré dans un tube propre et stérile. Le pot est rincé par 2ml de PBS-tween 0,05% stérile que l'on ajoute au précédent. Enfin le piston est également rincé par 1ml de PBS-tween 0,05% stérile ajouté lui-aussi au précédent. Les 5ml de broyat sont étalés après dilution successive sur milieu solide pour évaluer la charge bactérienne.

#### Extraction d'ADN génomique (ADNg) de mycobactéries :

Partir d'un culot bactérien d'une culture saturée de 5ml, le reprendre par 500µl de tampon d'extraction (50mM Tris-HCl, pH8, 10mM EDTA, 100mM NaCl). Transférer le tout dans un tube à vis de 2ml contenant 500µl de billes de verre 0,1mm et réaliser trois cycles de cassage d'une minute à la fréquence maximale entrecoupé d'une minute sur glace. Laisser décanter quelques minutes les billes et récupérer le surnageant dans un nouveau tube à vis de 2ml. Laver les billes par 200µl de tampon d'extraction et ajouter cet extrait au précédent. Ajouter au lysat 0,1 volume de SDS 10%, 0,01 volume de protéinase K à 10mg/ml et incubé 3h à 55°C. Ajouter un volume de Phénol/Chloroforme/Alcool isoamylique (25 :24 :1), mettre

sous agitation lente (balançier) à température ambiante pendant 30min puis centrifuger 10min à 13000rpm. Transférer la phase aqueuse supérieure dans un Eppendorf et ajouter un volume de Chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1) et remettre sous agitation lente à température ambiante pendant 5min puis centrifuger 10min à 13000rpm. Transférer la phase aqueuse supérieure dans un Eppendorf contenant un volume d'isopropanol et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M, pH 5,2, homogénéiser manuellement et délicatement par inversion et laisser 15 min sur glace, le temps que l'ADN précipite, puis centrifuger 10min à 13000rpm. Eliminer le surnageant et laver le culot souvent invisible par 500µl d'éthanol glacial (-20°C) à 70% et centrifuger 10 à 30 min à 13000 rpm. Pipeter rapidement le surnageant et éliminer le reste d'alcool à l'étuve 15 min à 55°C. Reprendre le culot d'ADN dans 100µl de Tris HCl, pH8 (Un court passage à 55°C favorise sa resuspension)

#### Conditions de Réaction de Polymérisation en Chaîne :

- Classique

Les réactions de PCR sont le plus souvent réalisés dans des volumes de 50µl sur 1µl d'ADN génomique dilué au 1/100 préparé comme précédemment. Lors d'expérience de criblage à haut débit, ces réactions peuvent être effectués sur bactéries entières pour *E.coli* en trempant succinctement une pointe de pipette enduite de bactéries directement dans le mélange réactionnel de PCR. Pour le criblage de mycobactéries, les réactions peuvent être réalisées sur 5µl du surnageant d'un lysat bactérien obtenu par trois cycles successifs de congélation/décongélation (azote liquide/eau bouillante) suivi d'un pulse de centrifugation pour culotter les débris cellulaires. Le mélange réactionnel est classiquement constitué de 2,5 unités de Taq DNA polymérase (Vent ou Pfu seront préférés lors d'amplification à haute fidélité), de tampon d'amplification spécifique de chaque polymérase, de dNTP 1mM final, des deux amorces à 1µM final et de Me<sub>2</sub>SO 10% final uniquement lors d'amplification de séquences de *Corynebacterineae* à haut pourcentage en GC. Après quelques minutes de dénaturation à 92°C, une trentaine de cycles sont effectués comportant une première phase de dénaturation de 15s à 92°C suivi de la phase d'hybridation de 15s à une température fonction du couple d'amorce (~10°C < T<sub>m</sub>) puis une phase d'élongation à 72°C d'une minute par kb, enfin quelques minutes à 72°C s'ensuivent pour permettre l'élongation de fragments incomplets.

- Dégénérées

La recherche de phase ouverte de lecture phylogénétiquement conservée dans l'évolution est réalisable suite à la conception d'oligonucléotides dits dégénérés car possédant une séquence nucléotidique variable à certaines positions mais comparable après traduction en terme d'usage de codons. Par souci de simplification en vue d'une meilleure efficacité d'amplification, nous avons choisi de favoriser les codons riche en GC adapté aux génomes d'intérêt de *Corynebacterineae* lors de la conception de nos oligonucléotides dégénérés. Les conditions de réaction sont relativement comparables à celles indiquées précédemment, à l'exception de la concentration en amorce plus élevé dans ce cas et de l'ordre de 4µM final.

#### Southern-Blot

A partir de 10µl d'une préparation d'ADN génomique décrite précédemment, réaliser une digestion sur la nuit par l'enzyme de restriction choisi pour mettre en évidence une insertion par recombinaison homologue du substrat d'échange allélique (AES) dans le

génomique de la bactérie analysé. Une bonne stratégie consiste à choisir une enzyme possédant un site unique dans l'AES et deux sites flanquant en externe de part et d'autre le fragment d'homologie cloné lors de la construction de cet AES. Ainsi ce même fragment d'homologie (environ 2kb) pourra être utilisé comme sonde d'hybridation après marquage chaud ou froid. Effectuer bien évidemment la même digestion sur l'ADN génomique de la souche sauvage. Déposer les digestions sur un gel d'agarose 0.6% le plus grand possible et faites migrer lentement sur la journée. Si le portoir du gel est gradué, prendre rapidement une photo sous UV pour repérer les différents marqueurs de taille, sinon placer une règle graduée à côté du gel. Traiter le gel 15 min à l'HCl 0.25N (dépurination partielle nécessaire pour le transfert de fragment supérieure à 5kb) et rincer à deux fois à l'eau. Pour une hybridation ultérieure, rincer la membrane en SSC6X et conserver là à 4°C dans du parafilm. Transférer le gel par buvardage de soude 0,4N sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose. Schématiquement, une plaque de verre est mise sur « pilotis » au-dessus d'une solution de soude. Placer deux couches de papier watman tombant de part et d'autre de la plaque dans la solution de soude. Placer le gel sur le watman en chassant les bulles d'air qui empêcheraient le transfert. Entourer la membrane de parafilm pour ne permettre le passage de la soude que par le gel et éviter ainsi le contact entre les couches supérieures et le watman imbibé de soude. Placer une membrane de même dimension sur le gel. Ajouter deux couches de watman de même dimension sur la membrane. Puis ajouter une bonne couche de papier absorbant surplombé d'un poids conséquent. Pour l'hybridation d'une sonde froide, suivre les indications du kit *AlkaPhosDirect* de chez Amersham Pharmacia Biotech. Succinctement, incuber quelques heures la membrane à 55°C en tampon d'hybridation supplémenté en NaCl 0.5M final, ADN de sperme de saumon à 4g/100ml et de la sonde préalablement couplée à la phosphatase alcaline. Rincer la membrane 2×30min à 75°C en tampon de lavage A (Urée 2M, SDS 1g/l, 100ml phosphate monosodique pH7 pour 1l final, NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 1M, ADN de sperme de saumon 2g) puis 2×5min en tampon de lavage B (Tris Base 50mM, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM) à température ambiante. Révéler à l'aide d'un kit de chimioluminescence associée à la phosphatase alcaline.

#### Purification des lipides extractibles de mycobactéries :

A partir d'une culture en 7H9/ADC sans Tween80 ou d'un voile de bactérie obtenu sur milieu Sauton après 45 jours de culture à 37°C, récupérer les cellules et les incubent au moins 12h à température ambiante en Chloroforme/Méthanol (2:1). Récupérer la phase organique dépourvu de cellules dans un ballon et ajouter aux bactéries à nouveau un mélange de Chloroforme/Méthanol (1:1) et laisser incubent au moins 12h à température ambiante. Répéter cette opération en utilisant cette fois un mélange Chloroforme/Méthanol (1:2). Sécher les phases organiques à l'évaporateur rotatif, reprendre l'extrait lipidique par du chloroforme, le transférer dans une ampoule à décanter et ajouter le même volume d'eau, bien agiter et laisser décanter. La phase chloroformique inférieure est récupérée et transvasée dans une ampoule à décanter propre pour un second lavage à l'eau. Après partition, la phase chloroformique est récupéré pour être séché à l'évaporateur rotatif, les lipides sont repris dans un faible volume de chloroforme pour être transféré dans un tube en verre taré et amenés à sec. Le poids des lipides extraits peut-être comparé à celui des résidus bactériens délipidés pour estimer le rendement de l'extraction optimal à 40%.

Les lipides relâchés dans le milieu de culture peuvent être isolés selon le protocole de Bligh et Dyer (1959) après filtration sur papier filtre et ajout de chloroforme et méthanol dans des proportions telles que H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH /CHCl<sub>3</sub> : 0,8/2/1. Laisser incubent 24h à température ambiante puis ajouter 0,5V d'eau et 0.5V de CHCl<sub>3</sub> pour déclencher la partition des deux

phases. Récupérer la phase organique et extraire à nouveau par 50ml de chloroforme. Ajouter la phase organique à la première et la sécher. Laver les lipides comme décrit précédemment pour les lipides extractibles.

#### Extraction des acides mycoliques liés aux mycobactéries :

Partir d'un culot bactérien préalablement délipidés ou non, le reprendre rapidement en méthylcellosolve (méthoxyéthanol), KOH 5% final et laisser incuber au moins 3h à 110°C pour permettre l'hydrolyse totale des liaisons esters qui lie les mycolates au tréhalose et à l'arabinogalactane. A l'issue de l'hydrolyse, acidifier le mélange à l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% pour protoner les sels d'acides gras libérés et favoriser leur extraction ultérieure par des solvants organiques. Extraire par deux fois le mélange d'hydrolyse acidifié à l'éther éthylique, les phases étherées réunies sont lavées dix fois à l'eau. A chaque lavage, l'éther après partition est retrouvé dans la phase supérieure qu'il faut donc traverser à la pipette pasteur pour retirer l'eau de lavage souillée. La phase organique est enfin transvasée dans un tube préalablement taré pour permettre la pesée de 30 à 50mg de lipides provenant à l'origine d'un culot de corynébactérie non délipidées issues d'une culture saturée de 50ml.

#### Purification de LAM/LM mycobactériens :

Partir au minimum de 500mg de résidus délipidés (quantité moyenne obtenue après purification des lipides extractibles d'un voile de mycobactérie). Bien sécher les résidus pour éliminer toute trace de solvant. Les transférer dans un tube plastique de 15ml compatible avec le diamètre de la sonde du sonicateur. Réhydrater les résidus par ajout de quelques millilitres d'eau suffisante pour l'immersion de la sonde. Placer le tube dans la glace et réaliser dix cycles de sonication à 90% et d'intensité maximale. Chaque cycle est composé d'une minute d'ultra-sons suivie d'une minute trente de pause pour le refroidissement. A l'issue de la sonication, transférer le lysat d'aspect laiteux dans un tube à centrifuger en verre et à bouchon contenant un barreau aimanté, bien rincer le tube ayant servi pour la sonication avec un large volume d'eau jusqu'à atteindre 40ml de volume total. Ajouter un volume équivalent d'éthanol absolu et placer le tout au bain-marie à 50°C sur un agitateur magnétique pendant 2h. Centrifuger succinctement et filtrer le surnageant dans un ballon pour l'évaporer au rotavap. Reprendre l'extrait dans un petit volume d'eau (≈ 5ml), le transférer dans un tube plastique taré de 15ml recouvert de parafilm percé manuellement puis lyophiliser l'extrait. Peser puis reprendre le lyophilisat d'aspect cotonneux dans 200µl de TrisHCl 20mM pH7,4, 1mM MgCl<sub>2</sub>. Ajouter 10 unités par gramme de lyophilisat de ribonucléase A et de DNase, incuber 2h à 37°C. Microdialyser (cut-off : 6-8kDa) deux heures contre du tampon phosphate 50mM, pH7. Ajouter de l'azide au 1/100 (0.1% final) pour prévenir les contaminations et digérer sur la nuit le lyophilisat à l'α-amylase, puis ajouter α-chymotrypsine et subtilopectidase VIII sur la journée puis trypsine sur la nuit. Dialyser, sécher et analyser sur gel de poly-acrylamide 15% 10, 20 et 50 µl d'suspension à 10µg/µl. La révélation se fait par coloration au nitrate d'argent comme suit : (les temps d'incubation sont indiqués entre parenthèse) 1) solution A : 50% méthanol, 12% TCA, 2% chlorure de cuivre (20min). 2) solution B : 10% éthanol, 5% acide acétique (10min). 3) 40% éthanol, 5% acide acétique + 0.7% d'acide périodique extemporanément (10min). 4) solution B (10min). 5) solution D : éthanol 10% (10min). 6) eau (10min). 7) solution E : nitrate d'argent 0.1% (10min). 8) eau (1min). 9) solution F : carbonate de potassium (1min). 10) solution G : carbonate de potassium 2% + 1µl/ml formaldéhyde (révélation). 11) solution B (2min). 12) eau (conservation).

## Méthodologie analytique biochimique des lipides :

- Chromatographie Couche Mince ou Thin Layer Chromatography (solvants et révélateurs)

Les lipides majoritaires sont rapidement visualisés sur ce type de chromatographie d'adsorption sur phase solide polaire composé de silice. Celle-ci permet en utilisant des mélanges de solvant appropriés de couvrir un large éventail de polarité dans des zones dites résolutive. Ainsi le dichlorométhane est classiquement utilisé pour analyser la présence de mycolates (Rf 0,3-0,4). Les lipides extractibles majoritaires sont couverts par des mélanges de chloroforme/méthanol/eau de polarité variable directement liée au volume d'eau présent dans le mélange : 60/16/2 (utilisé pour visualiser, entre autre, phospholipides et Phosphatidyl-Inositol Mannoside) ; 60/25/4 permet de résoudre le sulfolipide I du Cord Factor (ou Tréhalose-Di-Mycolate) ; les classes de Dimycosérosates de phytocérol (DIM ou encore PDIM) sont eux séparés soit par un mélange d'éther de pétrole/éther : 9/1 soit par un mélange de chloroforme/méthanol : 95/5.

Les lipides ainsi séparés sont révélés de manière non spécifique par la présence de chaînes grasses après pulvérisation de rhodamine et illumination de la plaque par des ultra-violets, ainsi les lipides sont repérables et ne subissent aucune modification chimique. Une méthode radicale et irréversible consiste à chauffer la plaque après pulvérisation d'acide sulfurique pur et permet de révéler avec un meilleur contraste la totalité des lipides. Il est possible de révéler plus spécifiquement les glycolipides par pulvérisation d'anthrone 0.2% dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pur qui après chauffage réagit de manière covalente avec les sucres et révèle ainsi les lipides glycosylés en bleu. Ce réactif est également utilisable pour réaliser un dosage des sucres face à une gamme étalon. Par ailleurs, la révélation spécifique de groupement phosphate constitutifs des phospholipides se fait par pulvérisation du réactif de Ditmer qui, après chauffage également, fait apparaître de tels lipides en bleu.

- CCM préparative

La purification de lipides au sein d'un mélange complexe peut être réalisée sur couche mince après dépôt sur une plaque de silice en masse et en ligne d'environ 10mg de lipides totaux pour une plaque de 20cm par 20cm. En effet, après migration, le lipide d'intérêt est visualisé après coloration de la plaque par la rhodamine. La zone de migration entouré discrètement au crayon à papier peut être gratter puis collecter dans un tube en verre. La silice ainsi récupéré est incubée dans de l'éther éthylique pour solubiliser le lipide à purifier. La phase étherée est filtrée sur une pipette pasteur obstruée par un morceau de coton et contenant une fraction de silice propre qui retiendra la rhodamine. Le lipide ainsi purifié après élution pourra faire l'objet d'études structurales ou de recherche d'activité biologique.

- Fractionnement sur phase solide

### 1. Colonne de chromatographie d'adsorption

Ce type de fractionnement basé sur les caractéristiques physico-chimiques de polarité des lipides peut-être réalisé soit sur colonne établi personnellement soit en utilisant des colonnes commerciales type « Sep-pack silice ». Ces dernières favorise *a fortiori* la reproductibilité des résultats. En outre, la première méthode permet d'adapter le volume de phase à la quantité de lipides à séparer. Celle-ci a pu être mise en œuvre pour la purification du tétradécyl-malonyl à partir de 20mg de lipides totaux de corynebactérie en utilisant une phase d'acide salicylique (70-230 meck). Utiliser une colonne telle que, la hauteur de phase soit dix fois supérieure à

son diamètre sachant que le volume de phase est déterminé par la nécessité que sa masse soit trente fois supérieure à celle des lipides chargés. Le volume d'éluion pour chaque fraction équivaut au volume de la colonne. Prendre garde à ne jamais amener la colonne à sec. Equilibrer la colonne avec le solvant de charge soit ici l'éther de pétrole. Charger le mélange de lipides avec un volume de solvant minimum. Faire passer un à un les différents mélanges de polarité décroissante contenant graduellement de un à dix pour cent d'éther éthylique dans cette étude. Finir par laver la colonne par un volume d'éther éthylique pur puis d'acide acétique. Analyser les fractions sur CCM et/ou en GC-MS.

## 2. Chromatographie d'échanges d'ions

L'utilité d'une telle chromatographie est particulièrement remarquable lors de la purification de sulfolipides via une colonne commercialisée nommée QMA pour Quaternary Methyl Ammonium qui en fait une phase échangeuse d'anions. Par conséquent, cette colonne retient tout ce qui est acide (chargé négativement). La colonne est conditionnée progressivement par 2ml de chacune des solutions suivantes :  $\text{NH}_4\text{OH}$  2%,  $\text{AcNH}_4^-$  0,01M,  $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{Cl}_3$  : 1/4 puis  $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{Cl}_3/\text{Eau}$  : 25/65/4 puis  $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{Cl}_3$  : 1/2 et enfin  $\text{CH}_3\text{Cl}_3$ . A ce stade, inverser la colonne. La fraction lipidique en  $\text{CH}_3\text{Cl}_3$  est ensuite déposée sur la colonne (10mg environ dans 2ml) et l'éluat constitue la première fraction qui reçoit 2ml de  $\text{CH}_3\text{Cl}_3$  pur supplémentaire de lavage. Puis une deuxième fraction est recueillie après écoulement de 2ml de  $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{Cl}_3$  : 1/2. Une troisième fraction sera constituée par l'éluion de 2ml de  $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{Cl}_3/\text{Eau}$  : 25/65/4. La dernière fraction contenant le sulfolipide sera obtenue après écoulement de 2ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  2%,  $\text{AcNH}_4^-$  0,01M,  $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{Cl}_3$  : 1/4

- Dérivés méthylés, triméthylsilylés et programme analytique de GC classique

Pour permettre leur migration en CCM, les acides gras non estérifiés doivent être dérivés sous forme d'esters de méthyl, de même, pour l'analyse en chromatographie gazeuse, les lipides acides pour pouvoir se volatiliser dans le capillaire sous l'effet de la chaleur, doivent être dérivés sous forme d'esters de méthyl ou d'éthyl. Pour ce faire, la méthode la plus utilisée dans cette étude a consisté à méthyler les lipides suite à l'action du diazométhane. Ce dernier est préparé extemporanément comme suit. Faire refroidir un Erlen-Meyer A contenant un fond de pastilles de KOH, fermé par un bouchon de liège recouvert de papier aluminium. Dans un Erlen-Meyer B, mélanger 3ml de KOH 40% à 15ml d'éther. Peser 1g de nitrosométhylurée puis le mélanger à l'Erlen-Meyer B en 4 à 5 fois tout en agitant l'Erlen-Meyer dans la glace. Attendre quelques minutes et transférer la phase étherée supérieure dans l'Erlen-Meyer A. Attendre 15 minutes, la solution est prête à l'emploi. Environ 1 ml de diazométhane est ajouté dans les tubes contenant les lipides à méthyler. Laisser réagir 15 minutes. Sécher sous air. Les lipides ensuite repris à 10mg/ml pour déposer une à deux pointes de pipettes pasteur à l'origine de la CCM.

La présence de groupements alcool sur une chaîne grasse nuit également à la volatilité de telles espèces. Ainsi une dérivatisation des fonctions hydroxyle suite à l'ajout covalent de groupements tri-méthyl-silylés (TMS) rend de telles molécules plus facilement volatiles. La réaction chimique est assez simple. Sécher dans un tube à vis bouchonné et coiffé d'une capsule de téflon, quelques  $\mu\text{g}$  des lipides à dériver sous flux d'azote. Sous hotte, resuspendre les lipides dans six gouttes de pyridine anhydre, ajouter quatre gouttes d'Hexa-Méthyl-DiSylasane (dégagement gazeux) puis terminer par deux gouttes de Tri-Méthyl-Silane. Conserver toujours cette stœchiométrie 6/4/2 entre les réactifs. Incuber 30min à température

ambiante, sécher sous flux léger d'azote et resuspendre dans 50 à 100µl d'éther de pétrole pour en injecter 0.5 à 1µl en GC.

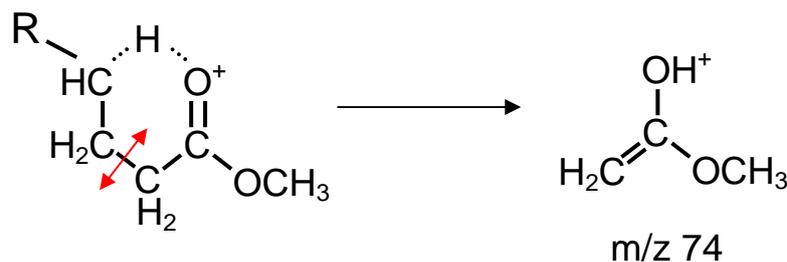
Classiquement, le gradient thermique utilisé est de 20°C/min de 60 à 100°C puis de 5°C/min de 100 à 300°C, un isotherme à 300°C peut-être nécessaire pour volatiliser certains acides gras longue chaîne.

- GC-MS (fragmentation de mac-lafferty, transestérification et programme analytique)

Les esters de méthyl après fragmentation génère des ions caractéristiques de m/z 74, décrit à l'origine par Mac Lafferty qui a laissé son nom à ce type de fragmentation. *A fortiori*, ce type de réarrangement est superposable pour des esters d'éthyl avec un gain de 14 unités de masse atomique (u.m.a) soit m/z 88. Ces esters d'éthyl sont réalisables soit par transestérification d'ester de méthyl soit par éthanolyse basique de lipides extractibles ou sur bactéries entières de lipides généralement estérifiés à des sucres.

Par ailleurs, les acides gras hydroxylés comme les acides mycoliques dérivés par des fonctions TMS génère des ions caractéristiques à m/z 73 due à la perte de ce groupement sous forme de Si<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. De plus, la perte d'un seul groupement méthyl du TMS laisse souvent apparaître un ion d'une masse inférieure de 15 u.m.a à la masse de l'ion moléculaire de l'espèce en question (M-15).

Le réarrangement de Mac Lafferty :



Le gradient thermique utilisé pour la GC-MS est de 20°C/min de 60 à 100°C puis de 8°C/min de 100 à 310°C, un isotherme à 310°C est déconseillé, il endommagerait l'électrode d'ionisation du spectromètre.

Préparation d'extraits protéiques totaux de mycobactéries :

Préférer au possible des milieux type LB au 7H9/ADC qui contamine fortement les extraits en albumine provenant de l'ADC (Albumine/Dextrose/Catalase). Pour les mycobactéries à croissance lente qui nécessite ce type de milieu, laver les bactéries après centrifugation par deux fois en PBS-Tween 0.05%. Dans les deux cas, le culot bactérien issu d'une culture de 50ml en début de saturation pour obtenir une biomasse viable optimale et resuspendu dans 1ml de PBS glacé. La suspension est réparti également dans deux tubes à vis de 2ml contenant 500µl de billes de verre stérile de 0.1mm de diamètre puis réaliser au « bead-bitter », trois cycles de cassage d'une minute à la fréquence maximale entrecoupé d'une minute sur glace. Laisser décanter quelques minutes les billes et récupérer le surnageant dans un nouveau tube à vis de 2ml. Laver les billes par 200µl de tampon d'extraction et ajouter cet extrait au précédent. Centrifuger le lysat quelques minutes à 13000rpm et le surnageant constitue l'extrait protéique.

### Immunoprécipitations sur billes de sépharose couplée protéine G :

Préparer du tampon d'immunoprécipitation ou TIP (Tris 50mM, pH 8, NaCl 150 mM, DTT 1mM, Inhibiteur de protéases, +/- Triton X100 0.5% ou Tween20 0.025%). Les billes de sépharose couplées protéine G sont conditionnés en EtOH 20%. Les laver à trois reprises par un excès de TIP, entrecoupé de pulse à 13000rpm pour sédimenter les billes. Estimer le volume des billes et rajouter un volume équivalent de TIP. Préparer un extrait protéique comme décrit précédemment en remplaçant le PBS par du TIP. Après dosage de l'extrait, pipetter 1mg de protéines totales et ajuster le volume à 500µl en TIP dans un Eppendorf et ajouter 200µl de protéine G sépharose conditionné précédemment puis incuber 1h sur roue à 4°C (pre-clearing). Après un pulse de centrifugation, récupérer le surnageant dépourvu de billes et le transférer dans un nouvel Eppendorf glacé. Ajouter 1 à 5 γ anticorps (observer la saturation à l'issue du western) puis incuber 12h sur roue à 4°C. Effectuer dans les mêmes conditions un contrôle avec un anticorps non relevant. Ajouter 200 µl de protéine-G sépharose à 50% en TIP et incuber 1h sur roue à 4°C. Centrifuger, conserver le surnageant pour estimer le rendement d'immuno-précipitation par western-blot puis laver à 3 reprises les billes par 1ml de TIP entrecoupé de pulse à 13000rpm en éliminant à chaque fois le surnageant de lavage. Ajouter un volume minimal (100µl environ) de tampon TIP contenant le peptide de synthèse de séquence correspondant à l'épitope reconnu par l'anticorps utilisé pour l'IP (rapport molaire de 10000 entre le peptide et l'anticorps). Incuber sur roue et sur la nuit à 4°C. Récupérer le surnageant, concentrer au speed-vac pour obtenir un volume raisonnable à déposer, ajouter un volume de tampon de dépôt 2X, incuber 1min à 95°C. Faire migrer les échantillons en gel de polyacrylamide. Colorer le gel ou le transférer sur membrane de nitrocellulose en vue d'un western-blot adéquat.

### Séparation de protéines sur gel de polyacrylamide

Entre deux plaques de verre, couler successivement un gel de résolution à ~1cm de l'extrémité du peigne puis un gel de concentration autour du peigne comme suit :

| <b>Gel de résolution</b> | 7%   | 8%  | 10% | 12% | 14% | 15%  |
|--------------------------|------|-----|-----|-----|-----|------|
| Acryl-Bis (40% 37.5/1)   | 1.75 | 2   | 2.5 | 3   | 3.5 | 3.75 |
| Tris HCl 1.5M pH 8 .8    | 2.5  | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5  |
| SDS 10%                  | 0.1  | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1  |
| H <sub>2</sub> O         | 5.65 | 5.4 | 4.9 | 4.4 | 3.9 | 3.65 |

$V_{\text{Totale}} = 10 \text{ ml}$   
+ 50µl APS 10%  
+ 5 µl Temed

| <b>Gel de concentration</b> |      |
|-----------------------------|------|
| Acryl-Bis (40% 37.5/1)      | 0.65 |
| Tris HCl 1.5M pH 8 .8       | 1.25 |
| SDS 10%                     | 0.05 |
| H <sub>2</sub> O            | 3.05 |

$V_{\text{Totale}} = 5 \text{ ml}$   
+ 50µl APS 10%  
+ 5 µl Temed

| <b>Tampon migration 10X</b> | 1litre |
|-----------------------------|--------|
| Tris base                   | 29g    |
| Glycine                     | 144g   |
| SDS                         | 10g    |

| <b>Tampon de dépôt 2X</b> |  | 10 ml  |
|---------------------------|--|--------|
| Tris, HCl 0.5M, pH 6.8    |  | 2.4 ml |
| SDS 10%                   |  | 0.1 ml |
| Glycérol                  |  | 2 ml   |
| Bleu de bromophénol 0.5%  |  | 1 ml   |
| H <sub>2</sub> O          |  | 4.4 ml |

+β-mercaptoéthanol à 5% final (50 µl/ml)

| <b>Tampon de transfert 25X</b> |         |
|--------------------------------|---------|
| Tris base                      | 30 g    |
| Glycine                        | 144 g   |
| Méthanol                       | 50 ml   |
| H <sub>2</sub> O               | qsp 1 l |

| <b>Bleu de coomassie</b> |        |
|--------------------------|--------|
|                          | 0.6 g  |
| Ethanol                  | 250 ml |
| H <sub>2</sub> O         | 200 ml |
| Acide acétique           | 50 ml  |

| <b>Solution de décoloration</b> |         |
|---------------------------------|---------|
|                                 | 1 litre |
| Ethanol                         | 125 ml  |
| H <sub>2</sub> O                | 800 ml  |
| Acide acétique                  | 75 ml   |

### Coloration au nitrate d'argent

Incuber le gel 10min dans 50ml d'une solution d'éthanol 40% + 25 µl de formaldéhyde. Puis effectuer deux rinçage à l'eau de 5 min. Ensuite, incuber le gel 1min dans 10ml de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5X (0.5g pour 500ml) + 40ml d'eau. Effectuer à nouveau deux rinçages à l'eau de 20 sec. Incuber maintenant le gel dans 50ml d'eau contenant 0.05 à 0.08g de nitrate d'argent pendant 10 min. Rincer le gel abondamment et rapidement à l'eau. Révéler par incubation du gel dans 50ml d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (pour 500ml de 5X : 75g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 10mg de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) + 25µl de formaldéhyde. Arrêter la coloration par ajout de 2.5ml d'une solution d'acide citrique 2.3M. Rincer à l'eau pour conserver le gel.

### Conditions de western-blot HA et c-myc

Préparer 500ml de PBS-Tween20 0.1%. Saturer la membrane 1h en PBS-Tween et lait lyophilisé 5% (m/V). Laver la membrane 3×5min en PBS-Tween. Incuber la membrane 1h avec l'anticorps primaire au 1/10000<sup>ème</sup>. Laver la membrane 3×5min en PBS-Tween. Incuber la membrane 1h avec un anticorps secondaire anti-souris couplé HRP (Horse-Raddish-Peroxydase) au 1/5000<sup>ème</sup>. Laver la membrane 3×5min en PBS-Tween. Révéler la membrane à l'aide d'un kit ECL. Exposer. L'anticorps monoclonal anti-HA est dirigé contre un épitope linéaire peptidique de séquence YPYDVDPDYA et provient du clone HA7 commercialisé par Sigma-Aldrich. L'anticorps monoclonal anti-c-myc est dirigé contre un épitope linéaire peptidique de séquence EQKLISEEDL et provient du clone 9E10 commercialisé par Sigma-Aldrich.



## V) ANNEXES

### Annexe 1 : Petit lexique du mycobactériologiste

Cachexie : Atteinte très sévère de toutes les fonctions de nutrition de l'organisme.

Écrouelles : Lésions cutanées dues aux adénites tuberculeuses chroniques, atteignant surtout le cou.

Endémie : Maladie qui règne habituellement dans un pays.

Étiologique : Relatif à l'étiologie, science des causes, partie de la médecine qui étudie les causes de la maladie.

Fistule : Conduit anormal faisant communiquer une cavité ou un organe avec un autre ou avec l'extérieur de l'organisme.

Hémoptysie : Evacuation par la bouche, crachement du sang qui provient des voies respiratoires.

Incidence : En médecine, nombre de cas nouveaux d'une maladie ou de sujets atteints d'une maladie dans une population déterminée et durant un laps de temps donné.

Mal de Pott ou Spondylodiscite tuberculeuse : maladie infectieuse du tissu osseux correspondant à une tuberculose des disques intervertébraux.

Méthode anatomo-clinique : Confrontation systématique des signes observés sur le patient avec les lésions constatées à l'examen pathologique des cadavres.

Miliaire tuberculeuse : Terme employé pour désigner une image observée sur la radiographie du poumon tuberculeux, caractérisée par de petites opacités arrondies, très nombreuses, de la taille d'un grain de mil.

Pathogénie ou pathogénèse : Mécanismes par lesquels les causes des maladies déclenchent l'évolution de celles-ci.

Phthisie : Mot grec signifiant consommation. Affection des poumons due à un virus ou à une bactérie, et dont il existe plusieurs formes, utilisé autrefois pour désigner la tuberculose et dont la personne atteinte est littéralement « consommée » par la maladie.

Prévalence : Nombre de cas de maladies ou d'accidents qui surviennent dans une population donnée sans distinguer les nouveaux cas des anciens.

Sanatorium : Etablissement pour tuberculeux.

Scrofuleux : Qui est atteint de scrofule appelée aussi maladie des écrouelles (abcès ganglionnaire).

Tubercule ou granulome : Lésion histopathologique pathognomonique de la tuberculose, constitué de cellules épithélioïdes et de cellules géantes multinucléées entourées d'une couronne lymphocytaire et centrées par une zone de nécrose caséuse.



## Annexe 2 : Brevet



conseils en  
propriété industrielle

brevets d'invention  
marques - modèles  
copyright - logiciels  
contrats - consultations  
procès en contrefaçon

36, RUE DE ST PETERSBOURG  
75008 PARIS  
☎ (33) 01 53 21 11 00

FACSIMILE : (33) 01 53 21 08 88  
FACSIMILE : (33) 01 53 21 08 63  
E-mail : ores@cabinet-ores.com

---

# DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

## DEMANDE INTERNATIONALE PCT

---

N° PCT/FR2004/002257

Déposée le 6 septembre 2004

|  |   |                     |
|--|---|---------------------|
| avec revendication<br>de priorité du dépôt | } | n° 03 10470         |
|  |   | du 4 septembre 2003 |
|  |   | en France           |

**Au nom de :** CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE, UNIVERSITE PARIS SUD XI.

**Invention :** GUILHOT Christophe, DAFPE Mamadou, HOUSSIN Christine,  
PORTEVIN Damien, DE SOUSA Célia.

**TITRE :** UTILISATION DE LA PROTÉINE Pks 13 CODANT  
POUR LA CONDENSASE DES ACIDES  
MYCOLIQUES DES MYCOBACTÉRIES ET GENRES  
APPARENTÉS COMME CIBLE D'ANTIBIOTIQUES.



## VI) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aaron, L., Saadoun, D., Calatroni, I., Launay, O., Memain, N., Vincent, V., Marchal, G., Dupont, B., Bouchaud, O., Valeyre, D., and Lortholary, O. (2004) Tuberculosis in HIV-infected patients: a comprehensive review. *Clin Microbiol Infect* **10**: 388-398.
- Ait-Khaled, N., and Enarson, D. (1999) Tuberculose : Manuel pour les étudiants en médecine. *OMS*.
- Aldovini, A., Husson, R.N., and Young, R.A. (1993) The *uraA* locus and homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* **175**: 7282-7289.
- Armitige, L.Y., Jagannath, C., Wanger, A.R., and Norris, S.J. (2000) Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infect Immun* **68**: 767-778.
- Armstrong, J.A., and Hart, P.D. (1971) Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* **134**: 713-740.
- Armstrong, J.A., and Hart, P.D. (1975) Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* **142**: 1-16.
- Asselineau, J. (1982) Branched-chain fatty acids of mycobacteria. *Indian J Chest Dis Allied Sci* **24**: 143-157.
- Azad, A.K., Sirakova, T.D., Rogers, L.M., and Kolattukudy, P.E. (1996) Targeted replacement of the mycoerolic acid synthase gene in *Mycobacterium bovis* BCG produces a mutant that lacks mycosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4787-4792.
- Azad, A.K., Sirakova, T.D., Fernandes, N.D., and Kolattukudy, P.E. (1997) Gene knockout reveals a novel gene cluster for the synthesis of a class of cell wall lipids unique to pathogenic mycobacteria. *J Biol Chem* **272**: 16741-16745.
- Azuma, I., Thomas, D.W., Adam, A., Ghuyssen, J.M., Bonaly, R., Petit, J.F., and Lederer, E. (1970) Occurrence of N-glycolylmuramic acid in bacterial cell walls. A preliminary survey. *Biochim Biophys Acta* **208**: 444-451.
- Balasubramanian, V., Pavelka, M.S., Jr., Bardarov, S.S., Martin, J., Weisbrod, T.R., McAdam, R.A., Bloom, B.R., and Jacobs, W.R., Jr. (1996) Allelic exchange in *Mycobacterium tuberculosis* with long linear recombination substrates. *J Bacteriol* **178**: 273-279.
- Bardarov, S., Kriakov, J., Carriere, C., Yu, S., Vaamonde, C., McAdam, R.A., Bloom, B.R., Hatfull, G.F., and Jacobs, W.R., Jr. (1997) Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10961-10966.
- Bardarov, S., Bardarov Jr, S., Jr., Pavelka Jr, M.S., Jr., Sambandamurthy, V., Larsen, M., Tufariello, J., Chan, J., Hatfull, G., and Jacobs Jr, W.R., Jr. (2002) Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology* **148**: 3007-3017.
- Baulard, A., Kremer, L., and Locht, C. (1996) Efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria. *J Bacteriol* **178**: 3091-3098.
- Beck, J., Ripka, S., Siegner, A., Schiltz, E., and Schweizer, E. (1990) The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. *Eur J Biochem* **192**: 487-498.
- Behr, M.A., and Small, P.M. (1999) A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* **17**: 915-922.
- Belanger, A.E., Besra, G.S., Ford, M.E., Mikusova, K., Belisle, J.T., Brennan, P.J., and 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**: 11919-11924.
- Belisle, J.T., Vissa, V.D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P.J., and Besra, G.S. (1997) Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**: 1420-1422.
- Betts, J.C., Lukey, P.T., Robb, L.C., McAdam, R.A., and Duncan, K. (2002) Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol* **43**: 717-731.
- Boggild, A.K., Keystone, J.S., and Kain, K.C. (2004) Leprosy: a primer for Canadian physicians. *Cmaj* **170**: 71-78.
- Brandt, L., Elhay, M., Rosenkrands, I., Lindblad, E.B., and Andersen, P. (2000) ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* **68**: 791-795.
- Brandt, L., Feino Cunha, J., Weinreich Olsen, A., Chilima, B., Hirsch, P., Appelberg, R., and 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**: 672-678.

- Briken, V., Porcelli, S.A., Besra, G.S., and Kremer, L. (2004) Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* **53**: 391-403.
- Britton, W.J., and Lockwood, D.N. (2004) Leprosy. *Lancet* **363**: 1209-1219.
- Brodin, P., Eiglmeier, K., Marmiesse, M., Billault, A., Garnier, T., Niemann, S., Cole, S.T., and Brosch, R. (2002) Bacterial artificial chromosome-based comparative genomic analysis identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infect Immun* **70**: 5568-5578.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolingen, D., and Cole, S.T. (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3684-3689.
- Camacho, L.R., Ensergueix, D., Perez, E., Gicquel, B., and Guilhot, C. (1999) Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* **34**: 257-267.
- Camacho, L.R., Constant, P., Raynaud, C., Laneelle, M.A., Triccas, J.A., Gicquel, B., Daffe, M., and Guilhot, C. (2001) Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability barrier. *J Biol Chem* **276**: 19845-19854.
- Casanova, J.L. (2001) Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. *Swiss Med Wkly* **131**: 445-454.
- Chatterjee, D. (1997) The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr Opin Chem Biol* **1**: 579-588.
- Che, D., Campese, C., and B, D. (2004) Les cas de tuberculose déclarés en France en 2002. *Bull Epid Heb* **4**: 13.
- Clemens, D.L., and Horwitz, M.A. (1995) Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J Exp Med* **181**: 257-270.
- Clemens, D.L., and Horwitz, M.A. (1996) The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J Exp Med* **184**: 1349-1355.
- Colditz, G.A., Brewer, T.F., Berkey, C.S., Wilson, M.E., Burdick, E., Fineberg, H.V., and 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., Krogh, A., McLean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S., and Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544.
- Cole, S.T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K.D., Thomson, N.R., Wheeler, P.R., Honore, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R.M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., Fraser, A., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Lacroix, C., Maclean, J., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Quail, M.A., Rajandream, M.A., Rutherford, K.M., Rutter, S., Seeger, K., Simon, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Whitehead, S., Woodward, J.R., and Barrell, B.G. (2001) Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* **409**: 1007-1011.
- Collins, D.M., Kawakami, R.P., de Lisle, G.W., Pascopella, L., Bloom, B.R., and 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**: 8036-8040.
- Constant, P., Perez, E., Malaga, W., Laneelle, M.A., Saurel, O., Daffe, M., and Guilhot, C. (2002) Role of the pks15/1 gene in the biosynthesis of phenolglycolipids in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Evidence that all strains synthesize glycosylated p-hydroxybenzoic methyl esters and that strains devoid of phenolglycolipids harbor a frameshift mutation in the pks15/1 gene. *J Biol Chem* **277**: 38148-38158.
- Converse, S.E., Mougous, J.D., Leavell, M.D., Leary, J.A., Bertozzi, C.R., and Cox, J.S. (2003) MmpL8 is required for sulfolipid-1 biosynthesis and *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 6121-6126.
- Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G., and Orme, I.M. (1993) Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* **178**: 2243-2247.
- Corbett, E.L., Watt, C.J., Walker, N., Maher, D., Williams, B.G., Raviglione, M.C., and Dye, C. (2003) The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med* **163**: 1009-1021.
- Cortes, J., Haydock, S.F., Roberts, G.A., Bevitt, D.J., and Leadlay, P.F. (1990) An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* **348**: 176-178.

- Cox, J.S., Chen, B., McNeil, M., and Jacobs, W.R., Jr. (1999) Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* **402**: 79-83.
- Crowle, A.J., Dahl, R., Ross, E., and May, M.H. (1991) Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. *Infect Immun* **59**: 1823-1831.
- Daffe, M., Laneelle, M.A., Asselineau, C., Levy-Frebault, V., and David, H. (1983) [Taxonomic value of mycobacterial fatty acids: proposal for a method of analysis]. *Ann Microbiol (Paris)* **134B**: 241-256.
- Daffe, M., Lacave, C., Laneelle, M.A., and Laneelle, G. (1987) Structure of the major triglycosyl phenolphthiocerol of *Mycobacterium tuberculosis* (strain Canetti). *Eur J Biochem* **167**: 155-160.
- Daffe, M., Lacave, C., Laneelle, M.A., Gillois, M., and Laneelle, G. (1988) Polyphthienoyl trehalose, glycolipids specific for virulent strains of the tubercle bacillus. *Eur J Biochem* **172**: 579-584.
- Daffe, M., and Laneelle, M.A. (1988) Distribution of phthiocerol diester, phenolic mycosides and related compounds in mycobacteria. *J Gen Microbiol* **134**: 2049-2055.
- Daffe, M., and Draper, P. (1998) The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb Physiol* **39**: 131-203.
- Dao, D.N., Kremer, L., Guerardel, Y., Molano, A., Jacobs, W.R., Jr., Porcelli, S.A., and Briken, V. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun* **72**: 2067-2074.
- Demangel, C., Garnier, T., Rosenkrands, I., and Cole, S.T. (2005) Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. *Infect Immun* **73**: 2190-2196.
- DeRiemer, K., Garcia-Garcia, L., Bobadilla-del-Valle, M., Palacios-Martinez, M., Martinez-Gamboa, A., Small, P.M., Sifuentes-Osornio, J., and Ponce-de-Leon, A. (2005) Does DOTS work in populations with drug-resistant tuberculosis? *Lancet* **365**: 1239-1245.
- Doffinger, R., Altare, F., and Casanova, J.L. (2000) Genetic heterogeneity of Mendelian susceptibility to mycobacterial infection. *Microbes Infect* **2**: 1553-1557.
- Doherty, T.M. (2005) Real world TB vaccines : clinical trials in TB-endemic regions. *Vaccine* **23**: 2109-2114.
- Domenech, P., Reed, M.B., Dowd, C.S., Manca, C., Kaplan, G., and Barry, C.E., 3rd (2004) The role of MmpL8 in sulfatide biogenesis and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **279**: 21257-21265.
- Dubey, V.S., Sirakova, T.D., and Kolattukudy, P.E. (2002) Disruption of *msl3* abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation. *Mol Microbiol* **45**: 1451-1459.
- Dubey, V.S., Sirakova, T.D., Cynamon, M.H., and Kolattukudy, P.E. (2003) Biochemical function of *msl5* (*pks8* plus *pks17*) in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: biosynthesis of monomethyl branched unsaturated fatty acids. *J Bacteriol* **185**: 4620-4625.
- Dubnau, E., Chan, J., Raynaud, C., Mohan, V.P., Laneelle, M.A., Yu, K., Quemard, A., Smith, I., and Daffe, M. (2000) Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol Microbiol* **36**: 630-637.
- Dye, C., Williams, B.G., Espinal, M.A., and Raviglion, M.C. (2002) Erasing the world's slow stain: strategies to beat multidrug-resistant tuberculosis. *Science* **295**: 2042-2046.
- Embley, T.M., and Stackebrandt, E. (1994) The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* **48**: 257-289.
- Fernandez-Moreno, M.A., Martinez, E., Caballero, J.L., Ichinose, K., Hopwood, D.A., and Malpartida, F. (1994) DNA sequence and functions of the *actVI* region of the actinorhodin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Biol Chem* **269**: 24854-24863.
- Fine, P.E. (1995) Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* **346**: 1339-1345.
- Fischer, K., Scotet, E., Niemeyer, M., Koebernick, H., Zerrahn, J., Maillet, S., Hurwitz, R., Kursar, M., Bonneville, M., Kaufmann, S.H., and Schaible, U.E. (2004) Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10685-10690.
- Fitzmaurice, A.M., and Kolattukudy, P.E. (1998) An acyl-CoA synthase (*acoas*) gene adjacent to the mycocerosic acid synthase (*mas*) locus is necessary for mycocerosyl lipid synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. *J Biol Chem* **273**: 8033-8039.
- Fratti, R.A., Chua, J., Vergne, I., and Deretic, V. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5437-5442.
- Frieden, T.R., Sterling, T.R., Munsiff, S.S., Watt, C.J., and Dye, C. (2003) Tuberculosis. *Lancet* **362**: 887-899.
- Frothingham, R., Meeker-O'Connell, W.A., Talbot, E.A., George, J.W., and Kreuzer, K.N. (1996) Identification, cloning, and expression of the *Escherichia coli* pyrazinamidase and nicotinamidase gene, *pncA*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 1426-1431.

- Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J.C., Medina, N., Mansoor, H., Pryor, M., Duthoy, S., Grondin, S., Lacroix, C., Monsempe, C., Simon, S., Harris, B., Atkin, R., Doggett, J., Mayes, R., Keating, L., Wheeler, P.R., Parkhill, J., Barrell, B.G., Cole, S.T., Gordon, S.V., and Hewinson, R.G. (2003) The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7877-7882.
- George, K.M., Chatterjee, D., Gunawardana, G., Welty, D., Hayman, J., Lee, R., and Small, P.L. (1999) Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* **283**: 854-857.
- Gernaey, A.M., Minnikin, D.E., Copley, M.S., Dixon, R.A., Middleton, J.C., and Roberts, C.A. (2001) Mycolic acids and ancient DNA confirm an osteological diagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **81**: 259-265.
- Gibson, K.J., Eggeling, L., Maughan, W.N., Krumbach, K., Gurcha, S.S., Nigou, J., Puzo, G., Sahm, H., and Besra, G.S. (2003) Disruption of Cg-Ppm1, a polyprenyl monophosphomannose synthase, and the generation of lipoglycan-less mutants in *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **278**: 40842-40850.
- Gilleron, M., Stenger, S., Mazorra, Z., Wittke, F., Mariotti, S., Bohmer, G., Prandi, J., Mori, L., Puzo, G., and De Libero, G. (2004) Diacylated sulfoglycolipids are novel mycobacterial antigens stimulating CD1-restricted T cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* **199**: 649-659.
- Gillespie, S.H. (2002) Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 267-274.
- Glickman, M.S., Cox, J.S., and Jacobs, W.R., Jr. (2000) A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell* **5**: 717-727.
- Glickman, M.S. (2003) The *mmaA2* gene of *Mycobacterium tuberculosis* encodes the distal cyclopropane synthase of the alpha-mycolic acid. *J Biol Chem* **278**: 7844-7849.
- Gokhale, R.S., Tsuji, S.Y., Cane, D.E., and Khosla, C. (1999) Dissecting and exploiting intermodular communication in polyketide synthases. *Science* **284**: 482-485.
- Goren, M.B. (1970) Sulfolipid I of *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Rv. II. Structural studies. *Biochim Biophys Acta* **210**: 127-138.
- Goren, M.B., Brokl, O., and Schaefer, W.B. (1974a) Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: phthiocerol dimycocerosate and the attenuation indicator lipid. *Infect Immun* **9**: 150-158.
- Goren, M.B., Brokl, O., and Schaefer, W.B. (1974b) Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: correlation of virulence with elaboration of sulfatides and strongly acidic lipids. *Infect Immun* **9**: 142-149.
- Guilhot, C., Gicquel, B., and Martin, C. (1992) Temperature-sensitive mutants of the *Mycobacterium* plasmid pAL5000. *FEMS Microbiol Lett* **77**: 181-186.
- Gurcha, S.S., Baulard, A.R., Kremer, L., Loch, C., Moody, D.B., Muhlecker, W., Costello, C.E., Crick, D.C., Brennan, P.J., and Besra, G.S. (2002) Ppm1, a novel polyprenol monophosphomannose synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J* **365**: 441-450.
- Heath, R.J., White, S.W., and Rock, C.O. (2001) Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog Lipid Res* **40**: 467-497.
- Heldwein, K.A., and Fenton, M.J. (2002) The role of Toll-like receptors in immunity against mycobacterial infection. *Microbes Infect* **4**: 937-944.
- Hendrickson, L., Davis, C.R., Roach, C., Nguyen, D.K., Aldrich, T., McAda, P.C., and Reeves, C.D. (1999) Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem Biol* **6**: 429-439.
- Holmes, R.K. (2000) Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the *tox* gene. *J Infect Dis* **181** Suppl 1: S156-167.
- Hopwood, D.A., and Sherman, D.H. (1990) Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Genet* **24**: 37-66.
- Husson, R.N., James, B.E., and Young, R.A. (1990) Gene replacement and expression of foreign DNA in mycobacteria. *J Bacteriol* **172**: 519-524.
- Hutchinson, C.R. (1997) Biosynthetic Studies of Daunorubicin and Tetracenomyacin C. *Chem Rev* **97**: 2525-2536.
- IDR (2004) [Tuberculin intradermal reaction (IDR) or tuberculin test]. *Med Mal Infect* **34**: 358-363.
- Jackson, M., Raynaud, C., Laneelle, M.A., Guilhot, C., Laurent-Winter, C., Ensergueix, D., Gicquel, B., and Daffe, M. (1999) Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. *Mol Microbiol* **31**: 1573-1587.
- Jarlier, V., and Nikaïdo, H. (1994) Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* **123**: 11-18.
- Julian, E., Matas, L., Perez, A., Alcaide, J., Laneelle, M.A., and Luquin, M. (2002) Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM

- responses to 2,3-diacyltrehalose, 2,3,6-triacyltrehalose, and cord factor antigens. *J Clin Microbiol* **40**: 3782-3788.
- Jullien, D., Stenger, S., Ernst, W.A., and Modlin, R.L. (1997) CD1 presentation of microbial nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest* **99**: 2071-2074.
- Kalpana, G.V., Bloom, B.R., and Jacobs, W.R., Jr. (1991) Insertional mutagenesis and illegitimate recombination in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5433-5437.
- Kealey, J.T. (2003) Creating polyketide diversity through genetic engineering. *Front Biosci* **8**: c1-13.
- Keane, J., Remold, H.G., and Kornfeld, H. (2000) Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol* **164**: 2016-2020.
- Kremer, L., Baulard, A., and Besra, G.S. (2000) *Genetics of mycolic acid biosynthesis*. Washington: ASM Press.
- Kremer, L., Dover, L.G., Morbidoni, H.R., Vilcheze, C., Maughan, W.N., Baulard, A., Tu, S.C., Honore, N., Deretic, V., Sacchetti, J.C., Loch, C., Jacobs, W.R., Jr., and Besra, G.S. (2003) Inhibition of InhA activity, but not KasA activity, induces formation of a KasA-containing complex in mycobacteria. *J Biol Chem* **278**: 20547-20554.
- Laënnec, R.T. (1819) *Traité de l'auscultation médicale*.
- Lawn, S.D., Butera, S.T., and Shinnick, T.M. (2002) Tuberculosis unleashed: the impact of human immunodeficiency virus infection on the host granulomatous response to Mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect* **4**: 635-646.
- Leemans, J.C., Juffermans, N.P., Florquin, S., van Rooijen, N., Vervoordeldonk, M.J., Verbon, A., van Deventer, S.J., and van der Poll, T. (2001) Depletion of alveolar macrophages exerts protective effects in pulmonary tuberculosis in mice. *J Immunol* **166**: 4604-4611.
- Lemaitre, N., Sougakoff, W., Truffot-Pernot, C., and Jarlier, V. (1999) Characterization of new mutations in pyrazinamide-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis and identification of conserved regions important for the catalytic activity of the pyrazinamidase PncA. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1761-1763.
- Lemassu, A., and Daffe, M. (1994) Structural features of the exocellular polysaccharides of Mycobacterium tuberculosis. *Biochem J* **297** ( Pt 2): 351-357.
- Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., and Stover, C.K. (1996) Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. *J Bacteriol* **178**: 1274-1282.
- Malaga, W., Perez, E., and Guilhot, C. (2003) Production of unmarked mutations in mycobacteria using site-specific recombination. *FEMS Microbiol Lett* **219**: 261-268.
- Marrakchi, H., Laneelle, G., and Quemard, A. (2000) InhA, a target of the antituberculous drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, FAS-II. *Microbiology* **146** ( Pt 2): 289-296.
- Marsollier, L., Robert, R., Aubry, J., Saint Andre, J.P., Kouakou, H., Legras, P., Manceau, A.L., Mahaza, C., and Carbonnelle, B. (2002) Aquatic insects as a vector for Mycobacterium ulcerans. *Appl Environ Microbiol* **68**: 4623-4628.
- Mathur, M., and Kolattukudy, P.E. (1992) Molecular cloning and sequencing of the gene for mycocerosic acid synthase, a novel fatty acid elongating multifunctional enzyme, from Mycobacterium tuberculosis var. bovis Bacillus Calmette-Guerin. *J Biol Chem* **267**: 19388-19395.
- Matsunaga, I., Bhatt, A., Young, D.C., Cheng, T.Y., Eyles, S.J., Besra, G.S., Briken, V., Porcelli, S.A., Costello, C.E., Jacobs, W.R., Jr., and Moody, D.B. (2004) Mycobacterium tuberculosis pks12 produces a novel polyketide presented by CD1c to T cells. *J Exp Med* **200**: 1559-1569.
- McCune, R.M., Jr., McDermott, W., and Tompsett, R. (1956) The fate of Mycobacterium tuberculosis in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection to the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J Exp Med* **104**: 763-802.
- McFadden, J. (1996) Recombination in mycobacteria. *Mol Microbiol* **21**: 205-211.
- Menozi, F.D., Rouse, J.H., Alavi, M., Laude-Sharp, M., Muller, J., Bischoff, R., Brennan, M.J., and Loch, C. (1996) Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. *J Exp Med* **184**: 993-1001.
- Moody, D.B., and Besra, G.S. (2001) Glycolipid targets of CD1-mediated T-cell responses. *Immunology* **104**: 243-251.
- Niederweis, M. (2003) Mycobacterial porins--new channel proteins in unique outer membranes. *Mol Microbiol* **49**: 1167-1177.
- Nigou, J., Gilleron, M., Rojas, M., Garcia, L.F., Thurnher, M., and Puzo, G. (2002) Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microbes Infect* **4**: 945-953.
- Oddo, M., Renno, T., Attinger, A., Bakker, T., MacDonald, H.R., and Meylan, P.R. (1998) Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* **160**: 5448-5454.

- Ortalo-Magne, A., Dupont, M.A., Lemassu, A., Andersen, A.B., Gounon, P., and Daffe, M. (1995) Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus. *Microbiology* **141** ( Pt 7): 1609-1620.
- Otten, S.L., Stutzman-Engwall, K.J., and Hutchinson, C.R. (1990) Cloning and expression of daunorubicin biosynthesis genes from *Streptomyces peucetius* and *S. peucetius* subsp. *caesius*. *J Bacteriol* **172**: 3427-3434.
- Pabst, M.J., Gross, J.M., Brozna, J.P., and Goren, M.B. (1988) Inhibition of macrophage priming by sulfatide from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **140**: 634-640.
- Parrish, N.M., Dick, J.D., and Bishai, W.R. (1998) Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **6**: 107-112.
- Pelicic, V., Reyrat, J.M., and Gicquel, B. (1996a) Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. *J Bacteriol* **178**: 1197-1199.
- Pelicic, V., Reyrat, J.M., and Gicquel, B. (1996b) Positive selection of allelic exchange mutants in *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Microbiol Lett* **144**: 161-166.
- Pelicic, V., Jackson, M., Reyrat, J.M., Jacobs, W.R., Jr., Gicquel, B., and Guilhot, C. (1997) Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10955-10960.
- Pfeifer, B.A., and Khosla, C. (2001) Biosynthesis of polyketides in heterologous hosts. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 106-118.
- Piersimoni, C., and Scarparo, C. (2003) Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. *J Clin Microbiol* **41**: 5355-5365.
- Puech, V., Bayan, N., Salim, K., Leblon, G., and Daffe, M. (2000) Characterization of the in vivo acceptors of the mycoloyl residues transferred by the corynebacterial PS1 and the related mycobacterial antigens 85. *Mol Microbiol* **35**: 1026-1041.
- Puech, V., Guilhot, C., Perez, E., Tropis, M., Armitige, L.Y., Gicquel, B., and Daffe, M. (2002) Evidence for a partial redundancy of the fibronectin-binding proteins for the transfer of mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* **44**: 1109-1122.
- Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M., and Cole, S.T. (2002) Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* **46**: 709-717.
- Quadri, L.E., Sello, J., Keating, T.A., Weinreb, P.H., and 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**: 631-645.
- Rainwater, D.L., and Kolattukudy, P.E. (1985) Fatty acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* *Bacillus Calmette-Guerin*. Purification and characterization of a novel fatty acid synthase, mycocerosic acid synthase, which elongates n-fatty acyl-CoA with methylmalonyl-CoA. *J Biol Chem* **260**: 616-623.
- Ramaswamy, S.V., Amin, A.G., Goksel, S., Stager, C.E., Dou, S.J., El Sahly, H., Moghazeh, S.L., Kreiswirth, B.N., and Musser, J.M. (2000) Molecular genetic analysis of nucleotide polymorphisms associated with ethambutol resistance in human isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 326-336.
- Rao, V., Fujiwara, N., Porcelli, S.A., and Glickman, M.S. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule. *J Exp Med* **201**: 535-543.
- Raynaud, C., Laneelle, M.A., Senaratne, R.H., Draper, P., Laneelle, G., and Daffe, M. (1999) Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology* **145** ( Pt 6): 1359-1367.
- Reed, M.B., Domenech, P., Manca, C., Su, H., Barczak, A.K., Kreiswirth, B.N., Kaplan, G., and Barry, C.E., 3rd (2004) A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* **431**: 84-87.
- Reyrat, J.M., Berthet, F.X., and Gicquel, B. (1995) The urease locus of *Mycobacterium tuberculosis* and its utilization for the demonstration of allelic exchange in *Mycobacterium bovis* *Bacillus Calmette-Guerin*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8768-8772.
- Rousseau, C., Neyrolles, O., Bordat, Y., Giroux, S., Sirakova, T.D., Prevost, M.C., Kolattukudy, P.E., Gicquel, B., and Jackson, M. (2003a) Deficiency in mycolipenate- and mycosanoate-derived acyltrehaloses enhances early interactions of *Mycobacterium tuberculosis* with host cells. *Cell Microbiol* **5**: 405-415.
- Rousseau, C., Sirakova, T.D., Dubey, V.S., Bordat, Y., Kolattukudy, P.E., Gicquel, B., and Jackson, M. (2003b) Virulence attenuation of two Mas-like polyketide synthase mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **149**: 1837-1847.

- Rousseau, C., Turner, O.C., Rush, E., Bordat, Y., Sirakova, T.D., Kolattukudy, P.E., Ritter, S., Orme, I.M., Gicquel, B., and Jackson, M. (2003c) Sulfolipid deficiency does not affect the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv in mice and guinea pigs. *Infect Immun* **71**: 4684-4690.
- Rousseau, C., Winter, N., Pivert, E., Bordat, Y., Neyrolles, O., Ave, P., Huerre, M., Gicquel, B., and Jackson, M. (2004) Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell Microbiol* **6**: 277-287.
- Rozwarski, D.A., Grant, G.A., Barton, D.H., Jacobs, W.R., Jr., and Sacchettini, J.C. (1998) Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **279**: 98-102.
- Saunders, B.M., and Cooper, A.M. (2000) Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* **78**: 334-341.
- Saunders, B.M., Frank, A.A., Orme, I.M., and Cooper, A.M. (2002) CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis. *Cell Immunol* **216**: 65-72.
- Saxena, P., Yadav, G., Mohanty, D., and Gokhale, R.S. (2003) A new family of type III polyketide synthases in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **278**: 44780-44790.
- Sirakova, T.D., Thirumala, A.K., Dubey, V.S., Sprecher, H., and Kolattukudy, P.E. (2001) The *Mycobacterium tuberculosis* pks2 gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. *J Biol Chem* **276**: 16833-16839.
- Sirakova, T.D., Dubey, V.S., Cynamon, M.H., and Kolattukudy, P.E. (2003a) Attenuation of *Mycobacterium tuberculosis* by disruption of a mas-like gene or a chalcone synthase-like gene, which causes deficiency in dimycocerosyl phthiocerol synthesis. *J Bacteriol* **185**: 2999-3008.
- Sirakova, T.D., Dubey, V.S., Kim, H.J., Cynamon, M.H., and Kolattukudy, P.E. (2003b) The largest open reading frame (pks12) in the *Mycobacterium tuberculosis* genome is involved in pathogenesis and dimycocerosyl phthiocerol synthesis. *Infect Immun* **71**: 3794-3801.
- Somoskovi, A., Parsons, L.M., and Salfinger, M. (2001) The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res* **2**: 164-168.
- Stinear, T.P., Jenkin, G.A., Johnson, P.D., and Davies, J.K. (2000) Comparative genetic analysis of *Mycobacterium ulcerans* and *Mycobacterium marinum* reveals evidence of recent divergence. *J Bacteriol* **182**: 6322-6330.
- Stinear, T.P., Mve-Obiang, A., Small, P.L., Frigui, W., Pryor, M.J., Brosch, R., Jenkin, G.A., Johnson, P.D., Davies, J.K., Lee, R.E., Adusumilli, S., Garnier, T., Haydock, S.F., Leadlay, P.F., and Cole, S.T. (2004) Giant plasmid-encoded polyketide synthases produce the macrolide toxin of *Mycobacterium ulcerans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 1345-1349.
- 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., and Neyrolles, O. (2003) DC-SIGN is the major *Mycobacterium tuberculosis* receptor on human dendritic cells. *J Exp Med* **197**: 121-127.
- Takayama, K., and Kilburn, J.O. (1989) Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 1493-1499.
- Takayama, K., Wang, C., and Besra, G.S. (2005) Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* **18**: 81-101.
- Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C., and Julien, B. (2000) Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science* **287**: 640-642.
- Tanghe, A., Content, J., Van Vooren, J.P., Portaels, F., and Huygen, K. (2001) Protective efficacy of a DNA vaccine encoding antigen 85A from *Mycobacterium bovis* BCG against Buruli ulcer. *Infect Immun* **69**: 5403-5411.
- Trivedi, O.A., Arora, P., Sridharan, V., Tickoo, R., Mohanty, D., and Gokhale, R.S. (2004) Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria. *Nature* **428**: 441-445.
- Trivedi, O.A., Arora, P., Vats, A., Ansari, M.Z., Tickoo, R., Sridharan, V., Mohanty, D., and Gokhale, R.S. (2005) Dissecting the mechanism and assembly of a complex virulence mycobacterial lipid. *Mol Cell* **17**: 631-643.
- van Helden, P.D. (2003) The economic divide and tuberculosis. Tuberculosis is not just a medical problem, but also a problem of social inequality and poverty. *EMBO Rep* **4 Spec No**: S24-28.
- Vergne, I., and Daffe, M. (1998) Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells. *Front Biosci* **3**: d865-876.
- Villemin (1868) *Études sur la Tuberculose; Preuves Rationnelles et Expérimentales de sa Spécificité et Son Inoculabilité*. Paris: J. B. Bailliere.
- Wagner, D., and Young, L.S. (2004) Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. *Infection* **32**: 257-270.
- Walsh, C.T., Gehring, A.M., Weinreb, P.H., Quadri, L.E., and Flugel, R.S. (1997) Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr Opin Chem Biol* **1**: 309-315.

- Wayne, L.G., and Sohaskey, C.D. (2001) Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* **55**: 139-163.
- Weissman, K.J., Hong, H., Oliynyk, M., Siskos, A.P., and Leadlay, P.F. (2004) Identification of a phosphopantetheinyl transferase for erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Chembiochem* **5**: 116-125.
- Yadav, G., Gokhale, R.S., and Mohanty, D. (2003) Computational approach for prediction of domain organization and substrate specificity of modular polyketide synthases. *J Mol Biol* **328**: 335-363.
- Yuan, Y., Lee, R.E., Besra, G.S., Belisle, J.T., and Barry, C.E., 3rd (1995) Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 6630-6634.
- Zhang, N., Torrelles, J.B., McNeil, M.R., Escuyer, V.E., Khoo, K.H., Brennan, P.J., and Chatterjee, D. (2003) The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region. *Mol Microbiol* **50**: 69-76.
- Zimhony, O., Cox, J.S., Welch, J.T., Vilcheze, C., and Jacobs, W.R., Jr. (2000) Pyrazinamide inhibits the eukaryotic-like fatty acid synthetase I (FAI) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* **6**: 1043-1047.
- Zodpey, S.P., Bansod, B.S., Shrikhande, S.N., Maldhure, B.R., and Kulkarni, S.W. (1999) Protective effect of *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) against leprosy: a population-based case-control study in Nagpur, India. *Lepr Rev* **70**: 287-294.