

Caractérisation génétique, biochimique et structurale de l'ATP synthase des mycobactéries, la cible d'un nouvel antituberculeux de la famille des diarylquinolines

Elena Segala

▶ **To cite this version:**

Elena Segala. Caractérisation génétique, biochimique et structurale de l'ATP synthase des mycobactéries, la cible d'un nouvel antituberculeux de la famille des diarylquinolines. Microbiologie et Parasitologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PA066057 . tel-00836521

HAL Id: tel-00836521

https://theses.hal.science/tel-00836521

Submitted on 21 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCE DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

ECOLE DOCTORALE : COMPLEXITE DU VIVANT

Présentée par

ELENA SEGALA

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Caractérisation génétique, biochimique et structurale de l'ATP synthase des mycobactéries, la cible d'un nouvel antituberculeux de la famille des diarylquinolines.

Soutenue le mercredi 11 janvier 2012

Devant le jury composé de :

Mr le Prof. Bertrand FRIGUET	Président
Mr le Dr. Alain BAULARD	Rapporteur
Mme le Prof. Claudine MAYER	Rapporteur
Mme le Dr. Cécile BREYTON	Examinateur
Mme le Dr. Nadine LEMAITRE	Examinateur
Mr le Dr. Wladimir SOUGAKOFF	Directeur de thèse
Mme le Dr. Stéphanie PETRELLA	Co-Directeur de thèse

« After every arrival there is a leaving.

After every accomplishment there is another challenge. »

Mère Teresa de Calcutta

REMERCIEMENTS

Merci aux membres du jury, Mr le Prof. Bertrand Friguet, Mme le Prof. Claudine Mayer, Mr le Dr. Alain Baulard, Mme le Dr. Cécile Breyton et Mme le Dr. Nadine Lemaitre, pour avoir consacré leur temps à juger le travail que j´ai effectué au cours de ma thèse.

Merci au Prof. Vincent Jarlier pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et m'avoir offert la possibilité de faire ce travail.
Merci au Dr. Wladimir Sougakoff pour m'avoir fait toujours confiance et m'avoir confié cette thèse ambitieuse.
Merci au Dr. Stéphanie Petrella pour m'avoir appris de nombreuses choses pendant mon temps passé au laboratoire, pour sa disponibilité sans limites, ses conseils, sa patience, pour son aide précieux et pour son soutien constant. J'ai toujours eu confiance dans ce projet pas toujours simple et c'est surement grâce à toi !

Merci à Catherine Vénien-Bryan, à Ana-Andreea Arteni et à Jean-Michel Guigner de l'IMPMC (UPMC) pour les expériences de microscopie électronique et merci à Cédric Pionneau de la plateforme P3S pour son aide dans l'identification des protéines en spectrométrie de masse.

Un grand merci à toute l'équipe du Laboratoire de Bactériologie.
Merci à Aurélie pour son aide dans les commandes, pour avoir partagé avec moi chaque anniversaire et pour m'avoir appris comment on mange un œuf à la coque ! Merci à Maureen et à Céline pour leur aide au quotidien et pour les bons moments passés à table qui ont toujours portés du bonheur dans ma journée.
Merci à Laurence et à Florence pour leurs conseilles et leur encouragement au cours de la rédaction de cette thèse, et merci pour les soirées passées chez Jimmy ! Laurence, con chi parlerai in italiano adesso in laboratorio?
Merci à Rachid pour l'aide très précieux qu'il a apporté à mon projet de thèse, et merci à Estelle à qui je souhaite de se passionner au projet comme moi j'ai fait.

Merci à mes amis parisiens avec qui j'ai partagé mes soirées et mes week-ends, merci à qui est encore à Paris et à qui est déjà parti.
Un merci spécial à Eva pour son amitié sincère et son soutien, et à Rita, à Laura, à Emanuele, à Sara, à Gianluca, à Irene, à Pier et à Fabrizio pour les bons moments passés ensemble.
Merci à mes colocataires, à Elisa, à Silvia, à Valeria, à Gaia et particulièrement à Novalba, pour leur amitié et pour l'encouragement au quotidien.
Je ne vous oublierai pas !

Merci à Michele pour avoir bouleversé ma vie, parce que sans toi cette dernière année serait été surement très différente.

Merci à tous mes amis en Italie qui ne m'ont jamais oublié.
Un grand merci à Raffaella, à Francesca, à Silvia, et à Marco pour être là, toujours.
(Grazie ai miei amici in Italia che non si sono mai dimenticati di me.
Un grazie di cuore alla Raffa, alla Fra, alla Silvia, e a Marco per esserci stati sempre.)

Le plus grand merci à mes parents pour m'avoir donné la possibilité de venir à Paris, pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix et donné le courage dans les moments les plus difficiles.
(Il grazie più grande va ai miei genitori per avermi dato la possibilità di venire a Parigi, per avermi sempre sostenuta nelle mie scelte e avermi dato il coraggio necessario per affrontare i momenti più difficili.)
Merci à Serena, ma grande sœur qui a toujours été fière de moi, et merci à ma petite nièce Adele à qui je souhaite d'avoir des grands rêves pour son avenir et d'avoir envie, un jour, de voyager et de voir le monde.
(Grazie alla Serena, la mia sorellona che è sempre stata fiera di me, e grazie alla mia nipotina Adele a cui auguro di aver grandi sogni per il suo futuro e, un giorno, di aver voglia di viaggire e di vedere il mondo.)

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS 1

SOMMAIRE 3

LISTE DES FIGURES 7

LISTE DES TABLEAUX 9

ABREVIATIONS 10

INTRODUCTION

1. LES MYCOBACTERIES 11

1.1. CLASSIFICATION DES MYCOBACTERIES 11
1.2. CARACTERISTIQUES BACTERIOLOGIQUES DES MYCOBACTERIES 12
1.3. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DU GENOME DES MYCOBACTERIES 13
1.4. ENVELOPPE MYCOBACTERIENNE 14

2. LA TUBERCULOSE 15

2.1. NOMBRE DE CAS ET LOCALISATION DANS LE MONDE 16
2.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA TUBERCULOSE 17
2.3. LE TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE 19
2.3.1. Antibiotiques de première ligne et leur mode d'action 20
2.4. LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES 21
2.4.1. Resistance naturelle 21
2.4.2. Resistance acquise 21
2.4.3. MDR-TB et XDR-TB 22
2.4.3.1. MDR-TB 22
2.4.3.2. XDR-TB 23
2.4.3.3. Traitement des cas de MDR-TB et XDR-TB 24

3. LES NOUVEAUX ANTIBIOTIQUES ET LE TMC207 25

3.1. LES NOUVEAUX ANTITUBERCULEUX 27
3.2. LE TMC207 29
3.2.1. Identification de la cible du TMC207 31
3.2.2. Essais cliniques 33
3.2.2.1. Etudes chez la souris 33
3.2.2.2. Etudes chez le cochon d'Inde 34
3.2.2.3. Etudes chez l'homme 34
3.2.3. Le TMC207 et les bactéries en phase non-réplicative 35
3.2.4. Etudes in vivo sur les autres mycobactéries pathogènes 35

4. ATP SYNTHASE 36

4.1. LA FAMILLE DES ATPASES 37
4.2. L'ATP SYNTHASE : GENERALITES ET PLACE DANS LA CELLULE 39
4.3. STRUCTURE DU DOMAINE F_1 DE L'ATP SYNTHASE 41
4.3.1. Les sous-unités α et β 41
4.3.2. La sous-unité γ 43
4.3.3. La sous-unité δ 43
4.3.4. La sous-unité ε 43
4.4. STRUCTURE DU DOMAINE F_O DE L'ATP SYNTHASE 44
4.4.1. La sous-unité a 45
4.4.2. La sous-unité b 45
4.4.3. La sous-unité c 46
4.5. MECANISME D'ACTION DE L'ATP SYNTHASE 52
4.5.1. La synthèse de l'ATP via le domaine F_1 52
4.5.2. Le transfert des ions via le domaine F_O 54

4.5.3. La synthèse de l'ATP via le domaine F_1 se fait grâce au transfert des ions via le domaine F_O 57
4.6. L'ATP SYNTHASE DES MYCOBACTERIES 58
4.6.1. La chaîne respiratoire mycobactérienne 58
4.6.2. Caractéristiques de l'ATP synthase mycobactérienne 59
4.6.3. Régulation de l'ATP synthase mycobactérienne 61
4.6.4. Régulation de l'ATP synthase dans les bacilles en phase de dormance 62
5. OBJECTIFS DU PROJET 62

MATERIEL ET METHODES

1. TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE 65
1.1. SELECTION DES MUTANTS RESISTANTS AU TMC207 65
1.2. PREPARATION DES CELLULES ELECTROCOMPETENTES 66
1.3. TRANSFORMATION PAR ELECTROPORATION DE *M. SMEGMATIS* 66
1.3.1. Transformation de M. smegmatis pour les tests de complémentation 66
1.3.2. Transformation de M. smegmatis pour les tests d'inactivation 66
1.4. CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI) DU TMC207 67
1.4.1. Mesure de la CMI pour les clones résistants au TMC207 67
1.4.2. Mesure de la CMI pour les souches de M. smegmatis complémentées 67
2. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE 68
2.1. AMPLIFICATIONS PAR POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) 68
2.1.1. Amplification des gènes atpE et atpB des clones résistants au TMC207 68
2.1.2. Amplification de l'opéron atp de M. tuberculosis 68
2.1.3. Amplification de la région de régulation de l'opéron atp des clones de M. abscessus et M. tuberculosis résistantes au TMC207 69
2.1.4. Amplification des gènes rv1846c, rv1845c, mab_2414 et mab_2415 des souches de M. abscessus et M. tuberculosis résistantes au TMC207 69
2.1.5. Analyse des clones de M. smegmatis obtenus dans le cadre de l'inactivation du gène atpE 70
2.2. SEQUENÇAGE DES PRODUITS D'AMPLIFICATION 71
2.3. SOUTHERN BLOT 71
2.3.1. Southern Blot pour déterminer le nombre de copie du gène atpE dans le génome de M. smegmatis et M. tuberculosis 71
2.3.2. Southern Blot pour l'analyse des clones de M. smegmatis obtenus lors des tests d'inactivation du gène atpE 72
2.3.3. Transfert des fragments de la digestion sur une membrane et hybridation de la sonde 73
2.4. LES CLONAGES 74
2.4.1. Les vecteurs pLYGatpEsme et pLYGatpEBK : clonage du gène atpE de M. smegmatis et de M. tuberculosis dans le vecteur pLYG204.zeo pour les tests de complémentation 74
2.4.1.1. Amplification du gène *atpE* de *M. smegmatis* et de *M. tuberculosis* 74
2.4.1.2. Premier clonage dans le vecteur pMOSBlue 74
2.4.1.3. Clonage dans le vecteur pLYG204.zeo 75
2.4.2. Clonage du gène atpD de M. smegmatis dans le vecteur pLYG204.zeo pour les tests d'expression et purification de l'ATP synthase : vecteur pLYGatpDsme6H 76
2.4.3. Clonage du gène atpE de M. tuberculosis dans le vecteur pET29a pour les tests d'expression et purification de l'ATP synthase : vecteurs pET29atpEBK et pET29atpEBK6H 77
2.4.4. Clonage du gène atpE de M. tuberculosis dans le vecteur pET28a pour les tests d'expression et purification de l'ATP synthase : vecteur pET28atpEBK6H 78
2.5. MUTAGENESE DIRIGEE 78
2.5.1. Mutagénèse dirigée des vecteurs de la complémentation génique 78
2.5.2. Mutagénèse dirigée pour la construction d'un plasmide d'expression de la sous-unité c de M. smegmatis avec un His-Tag 80
2.6. CONSTRUCTION D'UNE CASSETTE D'INACTIVATION DU GENE *ATPE* DE *M. SMEGMATIS* 81
2.6.1. Amplification de 1000 pb en amont et en aval du gène atpE de M. smegmatis et amplification du gène aph 81
2.6.1. Long-flanking homology (LFH)- PCR 82

2.7. CONSTRUCTION D'UN VECTEUR D'INACTIVATION 83
2.7.1. Première stratégie pour la construction du vecteur suicide 83
2.7.1.1. Clonage de la cassette d'inactivation dans le vecteur pCR2.1-TOPO 84
2.7.1.2. Clonage de la cassette d'inactivation dans le vecteur pGOAL19 84
2.7.2. Deuxième stratégie pour la construction du vecteur suicide 85
2.7.2.1 Amplification de 1000 pb aux extrémités du gène *atpE* de *M. smegmatis* et amplification du gène *aph* 87
2.7.2.2. Clonage dans le plasmide pCR2.1-TOPO 87
2.7.2.3. Clonage dans le vecteur p2NIL 87
2.7.2.4. Insertion des autres marqueurs de sélection dans le plasmide p2NIL contenant la cassette d'inactivation 88
2.8. REVERSE TRANSCRIPTION - PCR EN TEMPS REEL 88
2.8.1. Extraction de l'ARN total de M. abscessus 88
2.8.2. Réaction de RT-PCR en temps réel - TaqMan 89
2.8.3. Analyse des résultats de RT-PCR en temps réel 90

3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE STRUCTURALE 91

3.1. CONSTRUCTION DU MODELE STRUCTURAL DE L'ANNEAU DE SOUS-UNITE C MYCOBACTERIEN 91
3.2. DOCKING DU TMC207 DANS LES MODELES 91

4. TECHNIQUES DE PURIFICATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES 92

4.1. EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA SOUS-UNITE C DE *M. TUBERCULOSIS* 92
4.1.1. Expression hétérologue chez E. coli et purification de la sous-unité c de M. tuberculosis avec ou sans un His-Tag 92
4.1.2. Expression in vitro de la sous-unité c de M. tuberculosis 93
4.1.3. Expression hétérologue chez E. coli et purification de la sous-unité c de M. tuberculosis sous forme d'une protéine de fusion avec la Maltose Binding Protein 94
4.1.3.1. Production de la protéine 95
4.1.3.2. Purification de la protéine 95
4.1.3.3. Digestion de la protéine de fusion MBP-His-suc avec la thrombine 96
4.1.3.4. Digestion de la protéine de fusion His-MBP-suc avec la protéase TEV 97
4.2. EXPRESSION ET PURIFICATION DE L'ATP SYNTHASE DE *M. SMEGMATIS* 97
4.2.1. Expression homologue de la sous-unité c de M. smegmatis chez M. smegmatis sans tag 97
4.2.2. Expression homologue de la sous-unité c de M. smegmatis chez M. smegmatis avec un His-Tag 98
4.2.3. Expression homologue de la sous-unité β de M. smegmatis chez M. smegmatis 99
4.3. PRECIPITATION DES PROTEINES A L'ACIDE TRICHLOROACETIQUE (TCA) 100
4.4. WESTERN BLOT 101
4.5. BLUE NATIVE (BN) - PAGE 101

5. TECHNIQUES DE BIOPHYSIQUE 102

5.1. LA CRISTALLISATION 102
5.1.2. Principe de la cristallisation 102
5.1.2. Test de cristallisation de la protéine de fusion MBP+His-suc 103
5.1.3. Test de cristallisation de l'ATP synthase de M. smegmatis 103
5.2. LA SPECTROMETRIE DE MASSE 104
5.2.1. Principe de la spectrométrie de masse 104
5.2.2. MALDI-TOF 104
5.2.3. NanoLC-ESI-MS/MS 105
5.2.4. Préparation de l'échantillon pour la spectrométrie de masse 106
5.2.5. Analyse des résultats obtenus en spectrométrie de masse 106
5.3. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 106
5.3.1. Principe de la microscopie électronique 106
5.3.2. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique et analyses des images 107

ETUDE DE LA RESISTANCE AU TMC207

1. ETUDE DES MUTANTS RESISTANTS AU TMC207 109

2. COMPLEMENTATION GENIQUE 113

3. INACTIVATION DU GENE *ATPE* 117

4. UN AUTRE MECANISME DE RESISTANCE ? 126

5. MODELES STRUCTURAUX DES ANNEAUX C DE *M. TUBERCULOSIS* ET DE *M. SMEGMATIS* 130

6. DOCKING DU TMC207 DANS LE MODELE DE L'ANNEAU DE SOUS-UNITES C DE *M. TUBERCULOSIS* 137

EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA SOUS-UNITE C DE L'ATP SYNTHASE MYCOBACTERIENNE

1. LES PROTEINES MEMBRANAIRES 139

2. LES DETERGENTS 140

3. EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA SOUS-UNITE C DE *M. TUBERCULOSIS* 144

4. EXPRESSION ET PURIFICATION DE L'ATP SYNTHASE DE *M. SMEGMATIS* : PREMIERES ANALYSES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE 149

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 157

ANNEXES

ANNEXE 1 : CARTE DES VECTEURS UTILISES 173

ANNEXE 2 : SCHEMA DES ETAPES DE LA PURIFICATION D'UNE PROTEINE MEMBRANAIRE 178

ANNEXE 3 : TABLEAU RECAPITULATIF DES TESTS D'EXPRESSION DE LA SOUS-UNITE C DE *M. TUBERCULOSIS* CHEZ *E. COLI* 179

ANNEXE 4 : CODES PDB DE TOUTES LES STRUCTURES RESOLUES DES SOUS-UNITES DE LA F_1F_O-ATP SYNTHASE 182

ANNEXE 5 : PUBLICATION 183

REFERENCES 203

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Taux d'incidence de la tuberculose en 2009. 16
Figure 2. Prévalence du VIH dans les cas de tuberculose en 2009. 17
Figure 3. Schéma de l'infection par les bacilles tuberculeux dans le macrophage. 18
Figure 4. Structure chimique des antibiotiques de première ligne. 20
Figure 5. Les 27 Pays avec le nombre majeur de cas de MDR-TB. 23
Figure 6. Pays qui ont eu au moins un cas de XDR-TB avant fin mars 2011. 24
Figure 7. Selman Waksman, prix Nobel en 1952. 26
Figure 8. Structure chimique de quelques nouveaux antituberculeux 28
Figure 9. Configuration absolue du TMC207. 29
Figure 10. Alignement des séquences des sous-unités c de l'ATP synthase de différentes espèces mycobactériennes. 32
Figure 11. (A) Paul D. Boyer, (B) Jonh E. Walker, (C) Peter Mitchell 37
Figure 12. Organisation en sous-unités des F-, A- et V-ATPases. 38
Figure 13. Cycle des ions à travers la membrane biologique afin de produire l'ATP. 40
Figure 14. Organisation structurale de l'ATP synthase 41
Figure 15. Structure 3D du domaine $\alpha_3\beta_3\gamma$ de l'ATP synthase mitochondrial bovine. 42
Figure 16. Modèle de la transition entre les deux conformations de la sous-unité ε. 44
Figure 17. (A) Monomère de la sous-unité c de *E. coli,* (B) complexe F_1-c_{10} de la levure. 47
Figure 18. Structure de l'anneau de sous-unités c à 11 monomères de *I. tartaricus.* 48
Figure 19. Structure de l'anneau c à 15 monomères de *S. platensis*. 49
Figure 20. Structure de l'anneau c à 14 monomères du chloroplaste. 49
Figure 21. Structure de l'anneau à 13 monomères de *B. pseudofirmus* OF4. 50
Figure 22. Site de fixation de l'ion H+ ou Na+ dans l'ATP synthase. (A) *I. tartaricus*, (B) *S. platensis*, (C) chloroplaste, (D) *B. pseudofirmus* OF4. 52
Figure 23. Schéma d'un cycle de hydrolyse de l'ATP. 53
Figure 24. Mécanisme proposé pour le transfert des ions à travers le domaine $F_{O.}$ 56
Figure 25. Modèle général du mécanisme de rotation de l'ATP synthase. 57
Figure 26. Schéma de la chaîne respiratoire des mycobactéries. 59
Figure 27. Organisation de l'opéron *atp*. 60
Figure 28. Mécanisme de régulation de BlaI/BlaR. 61
Figure 29. Schéma d'amplification par PCR avec les amorces atpFAS et atpBS et atpE1 et atpE4 pour les colonies recombinantes. 70
Figure 30. Position d'hybridation des sondes utilisées pour l'analyse en Southern Blot des colonies recombinantes obtenues. 73
Figure 31. En gris la séquence du gène *atpE* de *M. smegmatis* ; en rouge la séquence du promoteur Hsp60 du vecteur pLYG204.zeo, en vert le site de coupure de *Msc*I, en fuchsia le site de coupure de *Sma*I. 75
Figure 32. Schéma des étapes de la construction d'une cassette d'inactivation pour le gène *atpE* de *M. smegmatis.* 81
Figure 33. Schéma de la réaction de LFH-PCR. 82
Figure 34. Schéma des étapes de la première stratégie pour la construction du vecteur d'inactivation. 83
Figure 35. Schéma des étapes de la deuxième stratégie pour la construction du vecteur d'inactivation. 86
Figure 36. Courbe d'amplification obtenue avec une réaction de PCR en temps réel. 90
Figure 37. Carte des plasmides (A) pMALc2 et (B) pTBMal/Rv1305. 94
Figure 38. (A) Diagramme de phase bidimensionnel d'une macromolécule en fonction de sa propre concentration et de la concentration d'un agent cristallisant. (B) La méthode de cristallisation à goutte assise. 103
Figure 39. Un spectromètre de masse MALDI-TOF. 105

Figure 40. Un spectromètre de masse LC-ESI-MS/MS. 105
Figure 41. Photo d'un microscope électronique en transmission. 107
Figure 42. Southern Blot effectué avec une sonde s'hybridant sur le gène *atpE* des digestions du génome de *M. tuberculosis* avec *Msc*I et *Nco*I. 112
Figure 43. Southern Blot avec une sonde s'hybridant sur le gène *atpE* des digestions du génome de *M. smegmatis* avec *Nhe*I et *Bgl*II. 114
Figure 44. Inactivation d'un gène d'intérêt. 117
Figure 45. Séquence du gène *aph* introduit dans le plasmide suicide. 119
Figure 46. Création de la cassette d'inactivation par LFH-PCR. 119
Figure 47. Produits d'amplification visibles sur le gel à la Figure 46A. 119
Figure 48. Digestion partielle par *Bam*HI du vecteur pTOPOcassette. 121
Figure 49. Vecteur pCR2.1-TOPO contenant la cassette d'inactivation. 121
Figure 50. Amplifications obtenus avec les amorces atpBS/FAS et atpE1/atpE4 pour 3 colonies recombinantes. 123
Figure 51. Inactivation d'*atpE* par pTOPOcassette. 124
Figure 52. Vecteur d'inactivation construit à partir de p2NIL. 125
Figure 53. Courbe d'amplification de la RT-PCR en temps réel pour les 4 ARN. 128
Figure 54. Niveau d'expression du gène *atpE* dans les souches résistantes cultivées sans et avec TMC207 par rapport à la souche sauvage. 129
Figure 55. Alignement des séquences de la sous-unité c de *M. abscessus*, *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *B. pseudofirmus* OF4, chloroplaste (*Spinacia olaracea*), *S. platensis* et *I. tartaricus*. 131
Figure 56. Représentation en surface des modèles d'anneaux c de l'ATP synthase de (A) *M. smegmatis* et (B) *M. tuberculosis*. 133
Figure 57. (A) Représentation en cartoon de la région contenant le résidu Glu61 dans notre modèle de l'anneau c de *M. tuberculosis*, (B-C-D) site de fixation de l'ion H+ ou Na+ dans l'ATP synthase de (B) *I. tartaricus*, (C) *S. platensis*, (D) chloroplaste. (E) Superposition des structures de deux monomères c de *S. platensis*, *I. tartaricus*, chloroplaste et du modèle de *M. tuberculosis*. 136
Figure 58. Docking du TMC207 dans le modèle d'anneau c de *M. tuberculosis*. 137
Figure 59. Classification des protéines membranaires. 139
Figure 60. Propriétés des détergents. 140
Figure 61. Schéma de l'extraction d'une protéine de la membrane par un détergent. 141
Figure 62. Gel SDS-PAGE 12% de l'élutions après purification sur résine d'amylose de la protéine de fusion MBP-His-suc. 146
Figure 63. Gel SDS-PAGE à 16% d'acrylamide de la digestion de la protéine de fusion MBP-His-suc par la thrombine. 147
Figure 64. Chromatographie de la purification sur résine d'amylose de MBP-His-suc. 148
Figure 65. Cristaux obtenus avec la condition I du kit Crystal Screen I (0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol). 149
Figure 66. Gel 14% de la purification de la sous-unité c de *M. smegmatis* selon le protocole de purification de l'anneau c de *I. tartaricus*. 150
Figure 67. Analyse en Western Blot de l'expression et de la purification de la sous-unité c de *M. smegmatis*. 152
Figure 68. Protocole de solubilisation de l'ATP synthase de *M. smegmatis*. 153
Figure 69. Profil d'élution de l'ATP synthase de *M. smegmatis* en chromatographie d'affinité de nickel. 153
Figure 70. SDS-PAGE 12% de la purification de l'ATP synthase de *M. smegmatis* par chromatographie d'affinité de nickel. 154
Figure 71. Chromatogramme de la purification de l'ATP synthase de *M. smegmatis* sur colonne Superdex^{TM} 200. 154
Figure 72. SDS-PAGE 12% et BN-PAGE de l'ATP synthase purifiée de *M. smegmatis*. 155
Figure 73. Image en microscopie électronique en coloration négative de l'ATP synthase de *M. smegmatis*. 156

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Groupes d'antibiotiques utilisés pour le traitement de la MDR-TB selon l'OMS. ____ 25

Tableau 2. Tableau récapitulatif des nouveaux antituberculeux avec leur mécanisme d'action et leur phase clinique de développement. _____ 28

Tableau 3. Les phases cliniques. _____ 29

Tableau 4. CMIs du TMC207 pour différentes espèces mycobactériennes. _____ 30

Tableau 5. CMIs du TMC207 pour différentes espèces bactériennes. _____ 31

Tableau 6. Nombre de monomères constituant l'anneau c de l'ATP synthase de différentes espèces._____ 46

Tableau 7. Modifications nucléotidiques introduites dans le gène *atpE* sauvage de *M. smegmatis* et de *M. tuberculosis* et mutations correspondantes induites dans la sous-unité c. _____ 79

Tableau 8. Mutants sélectionnés *in vitro* résistants au TMC207. _____ 111

Tableau 9. Constructions utilisées pour les tests de complémentation génique chez *M. smegmatis*._____ 115

Tableau 10. CMIs du TMC207 pour toutes les souches complémentées construites._____ 116

Tableau 11. CMI pour le TMC207 des clones de *M. abscessus* résistants au TMC207 sans mutation dans la sous-unité c de l'ATP synthase. _____ 127

Tableau 12. Pourcentage d'identité entre les séquences en acides aminés des sous-unités c de l'ATP synthase des 4 espèces mycobactériennes (*M. tuberculosis, M. smegmatis, M. fortuitum, M. abscessus*) et de *I. tartaricus, S. platensis, B. pseudofirmus* et chloroplaste._____ 132

Tableau 13. Les détergents les plus communs avec leur charge. _____ 142

ABREVIATIONS

ADP	Adénosine diphosphate
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATP	Adénosine triphosphate
BHI	Brain Heart Infusion
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DDM	N-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside
DO	Densité optique
His-Tag	tag de 6 (ou 8) histidines
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
MBP	Maltose Binding Protein
MDR-TB	MultiDrug Resistant Tuberculosis
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OADC	Acide oléique, albumine, dextrose et catalase
OMS	Organisation mondiale de la santé
pb	Paire de bases
PDB	Protein Data Bank
Pi	Phosphate inorganique
FPM	Force Proton Motrice
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
suc	sous-unité c de *M. tuberculosis*
FSM	Force Sodium Motrice
TB	Tuberculose
TriDM	N-Tridecyl-β-D-Maltopyranoside
Tris	Trishydroxyméthylaminométhane (diamino-dihydroxyméthyl-1,3-propanediol)
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
XDR-TB	Extensively Drug-Resistant Tuberculosis
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

INTRODUCTION

1. Les mycobactéries

1.1. Classification des mycobactéries

Les mycobactéries appartiennent au genre *Mycobacterium*, à la famille des *Mycobacteriaceae* et à l'ordre des Actinomycétales. Grâce aux nouvelles technologies qui ont énormément amélioré les méthodes d'identification, on compte à ce jour plus de 130 espèces mycobactériennes, avec une majorité d'espèces environnementales. On considère que les espèces isolées à partir de l'homme sont seulement la pointe de l'iceberg de toutes les espèces existantes (Hale, Pfyffer et al. 2001; Tortoli, Rindi et al. 2003; Primm, Lucero et al. 2004; Tortoli 2006).

Les mycobactéries possèdent trois caractéristiques essentielles (Shinnick and Good 1994) :

- l'acido-alcoolo-résistance. Les mycobactéries sont résistantes à la décoloration par l'action simultanée de l'acide et de l'alcool, principe de base de la coloration de Ziehl-Neelsen, d'où l'appellation de bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR). Cette propriété est liée à la présence d'une paroi très riche en lipides spécifiques, les acides mycoliques, qui font de la paroi mycobactérienne la paroi plus épaisse du monde bactérien (9-10 nm).

- la nature des acides mycoliques. Les acides mycoliques sont les acides gras les plus longs synthétisés dans la nature (Niederweis 2003). Les genres *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Gordona* et *Tsukamurella* ont tous des acides gras α-ramifiés β-hydroxylés : les acides mycoliques. Ceci explique que les germes correspondant peuvent être colorés par la coloration de Ziehl-Neelsen. Le genre *Mycobacterium* se différencie des autres par le haut poids moléculaire de ses acides mycoliques (chaînes de 60 à 90 atomes de carbone, contre 30 à 60 atomes de carbone pour *Rhodococcus* et *Nocardia* et de 20 à 30 pour les corynébactéries).

- un contenu élevé en G+C% de leur ADN. Le pourcentage en G+C de l'ADN des mycobactéries est élevé : 61% à 71%, excepté pour *Mycobacterium leprae* (55%) (Andersson and Sharp 1996).

Différentes classifications ont été utilisées pour distinguer les nombreuses espèces de mycobactéries :

- selon le temps de croissance, croissance lente >7 jours ou croissance rapide <7 jours ;
- selon la pathogénicité, pathogènes stricts de l'homme ou des animaux, espèces saprophytes ou commensales, pathogènes opportunistes ou non pathogènes ;
- selon la maladie qu'elles entraînent, tuberculose (TB), lèpre ou mycobactérioses.

D'un point de vue médical, les mycobactéries peuvent être classées en trois grandes catégories. La première comprend les mycobactéries responsables de la TB des mammifères ou mycobactéries du complexe *Mycobacterium tuberculosis* : *M. tuberculosis, Mycobacterium africanum, Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium canettii, Mycobacterium pinnipedii, Mycobacterium caprae* et *Mycobacterium microti*. La deuxième catégorie est représentée par *M. leprae* et *Mycobacterium lepraemurium*, responsables respectivement de la lèpre de l'homme et de la lèpre du rat. La troisième catégorie comprend toutes les autres mycobactéries : saprophytes ou commensales des animaux, qui sont désignées par le terme générique de mycobactéries "atypiques" (NTM, Nontuberculous Mycobacteria). Ces espèces, dans certaines conditions, peuvent être responsables d'infections opportunistes chez l'homme (*Mycobacterium avium*, *Mycobacterium xenopi, Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*…). La plus pathogène d'entre elles produit une toxine dermonécrotique (*Mycobacterium ulcerans*).

1.2. Caractéristiques bactériologiques des mycobactéries

Les mycobactéries sont des bacilles aérobies stricts ou microaérophiles, immobiles, non sporulés. Elles sont très résistantes à la dessiccation et survivent jusqu'à plusieurs années à l'état desséché. Bien qu'elles ne se colorent que très faiblement par la coloration de Gram, les mycobactéries ont longtemps été rattachées aux bactéries à Gram positif mais leur paroi possède toutefois des caractéristiques communes aux bactéries à Gram négatif (Fu and Fu-Liu 2002).

Les mycobactéries se distinguent des autres espèces bactériennes par leurs exigences de culture et leur lenteur de croissance. Seuls les milieux qui contiennent du sérum, de la glycérine, de la pomme de terre glycérinée, de l'œuf ou de l'albumine bovine permettent une culture abondante : milieu Löwenstein-Jensen, milieux de Middlebrook (7H9, 7H10, 7H11) supplémentés par de l'OADC (acide oléique, albumine, dextrose et catalase). Leur température optimale de croissance varie de 30°C à 45°C. Leur temps de génération varie de 2 heures à 20 heures pour la majorité des mycobactéries mais peut aller jusqu'à 14 jours pour *M. leprae*, seule mycobactérie qui ne peut pas être cultivée *in vitro*. Des colonies sur milieux gélosés apparaissent après 2 jours d'incubation pour les mycobactéries à croissance rapide et jusqu'à 12 semaines pour les mycobactéries à croissance lente.

Parasite strict de l'homme, *M. tuberculosis* est le principal agent de la tuberculose (TB) humaine. Son temps de division est en moyenne de 20 heures, les cultures sur milieu solide ne sont positives qu'après 21 à 28 jours d'incubation à 37°C, et après un délai un peu plus court (10 à 15 jours) lorsqu'on utilise un milieu liquide. Sur les milieux contenant de l'œuf, les colonies sont de couleur crème-beige, sèches, rugueuses, en « chou-fleur ».

1.3. Principales caractéristiques du génome des mycobactéries

Aujourd'hui, nous avons à notre disposition sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information) la séquence du génome de 13 mycobactéries, dont *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. smegmatis* et *M. ulcerans*. La taille du génome des mycobactéries varie de $3.2x10^6$ pb pour *M. leprae* à pratiquement $7x10^6$ pb pour *M. smegmatis*. Il est en général plus grand que celui des autres organismes procaryotes (le génome de *Streptococcus pneumoniae* a par exemple une taille de $2.0x10^6$ pb, celui de *Escherichia coli* de $4.6X10^6$ pb).

La séquence complète du génome de *M. tuberculosis* H37Rv a été publiée en 1998. Le génome contient $4.4x10^6$ pb et se caractérise par une teneur en guanine et cytosine (G+C) élevée (66%) (Cole, Brosch et al. 1998).

La teneur en G+C% est élevée pour toutes les mycobactéries, entre 61 et 71% contre 25 à 75% dans le monde procaryote (56% pour *E. coli*). La richesse en G+C du genre mycobactérien explique en partie que le codon GTG soit utilisé comme codon d'initiation pour 35% des gènes de *M. tuberculosis* (contre 14% chez *E. coli*), mais également que les différentes protéines de mycobactéries soient composées préférentiellement d'acides aminés codés par des codons riches en G et C (Ala, Gly, Pro, Arg et Trp) (Cole, Brosch et al. 1998; Cole 2002).

M. tuberculosis, comme les autres mycobactéries à croissance lente, possède une seule copie de l'opéron ribosomal qui est éloigné de 1 Mpb de l'origine de réplication *oriC.* Chez les autres espèces bactériennes, il y a en général plusieurs copies de cet opéron (7 chez *E.* coli) dont l'une au moins est située près de l'origine de réplication (Cole, Brosch et al. 1998). Par ailleurs, 59% des gènes sont transcrits dans le même sens que la fourche de réplication ce qui peut expliquer en partie la lenteur de croissance.

Le génome de *M. tuberculosis* est caractérisé par un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras (8% du génome environ) : il en contient 250, alors que le génome de *E. coli* n'en contient que 50 (1.5% du génome environ). Ceci est vraisemblablement lié à la capacité de *M. tuberculosis* à synthétiser des acides gras, des plus simples comme l'acide palmitique aux plus complexes comme les acides mycoliques qui entrent dans la composition de sa paroi (Cole, Brosch et al. 1998).

1.4. Enveloppe mycobactérienne

L'enveloppe cellulaire des mycobactéries est constituée de trois composants structuraux (Daffe and Etienne 1999) :

- une membrane plasmique typique, à laquelle peuvent être associés des caroténoïdes donnant la couleur jaune-orange aux mycobactéries photochromogenique comme *M. gordonae* et *M. kansaii* (Brennan and Nikaido 1995). Elle ne joue pas de rôle dans la pathogénicité de la bactérie ;

- la paroi, qui possède les caractéristiques des bactéries à Gram négatif (Fu and Fu-Liu 2002). Elle est composée de peptidoglycane (motif de base : polymère de N-acétylglucosamine-β 1-4-acide N-glycolyl muramique) relié de manière

covalente à un hétéroside, l'arabinogalactane, qui est lui-même estérifié par des acides mycoliques (acides gras ramifiés à très longues chaînes composés de 60 à 90 atomes de carbone). C'est la paroi qui confère aux mycobactéries la résistance à la plupart des antibiotiques et des désinfectants, ainsi qu'une résistance à l'action de bases et d'acides (Brennan and Nikaido 1995; Alderwick, Birch et al. 2007; Zuber, Chami et al. 2008) ;

- une capsule : un mélange de polysaccharides, protéines et lipides, avec une composition différente entre mycobactéries pathogènes et non-pathogènes (Sani, Houben et al. 2010). Chez les espèces pathogènes, la présence de certains glycanes dans la capsule est fondamentale pour l'interaction avec le macrophage et pour inhiber la réponse pro-inflammatoire. La capsule représente aussi une barrière passive qui empêche la diffusion de macromolécules à l'intérieur de l'enveloppe bactérienne. Elle secrète des enzymes impliquées dans la détoxification d'intermédiaires d'oxygène réactifs (catalase, peroxydase, superoxyde dismutase) qui sont impliqués dans la résistance de la bactérie aux mécanismes microbicides de l'hôte (Daffe and Etienne 1999).

2. La tuberculose

La tuberculose (TB) est dans le monde la deuxième cause de mortalité par maladie infectieuse après le SIDA. De nombreuses preuves témoignent de l'existence de cette maladie en 2400AJC à l'époque des anciens égyptiens (Ziskind and Halioua 2007), mais son origine semble être encore plus lointaine. La souche originelle serait apparue en Afrique de l'est il y a trois millions d'années (infectant les premiers hominidés) et son développement et son expansion à travers le monde seraient intimement liés à celle de l'homme (Gutierrez, Brisse et al. 2005).

Malgré son ancienneté et tous les efforts pour l'éradiquer, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'aujourd'hui un tiers de la population mondiale est atteint de cette maladie. C'est pour cette raison que la lutte contre la

TB fait partie des huit Objectifs du Millénaire pour le Développement (OMD) (www.who.org).

2.1. Nombre de cas et localisation dans le monde

En 2009, selon l'OMS (WHO Report 2010) il y avait 9,4 millions de nouveaux cas de TB, soit 137 cas pour 100 000 habitants (en 2008 il y avait 139 cas pour 100 000 habitants) (Figure 1). La majorité des cas ont été identifiés en Asie (55%) et en Afrique (30%), 7% dans l'est méditerrané, 4% en Europe et 3% en Amérique. Les cinq premiers pays en terme de nombre total de cas incidents en 2009 étaient l'Inde (1.6-2.4 millions), la Chine (1.1-1.5 millions), l'Afrique du Sud (0.40-0.59), le Nigeria (0.37-0.55) et l'Indonésie (0.35-0.52). L'Inde à elle seule représente 21% des cas de TB à travers le monde, l'Inde et la Chine 35%.

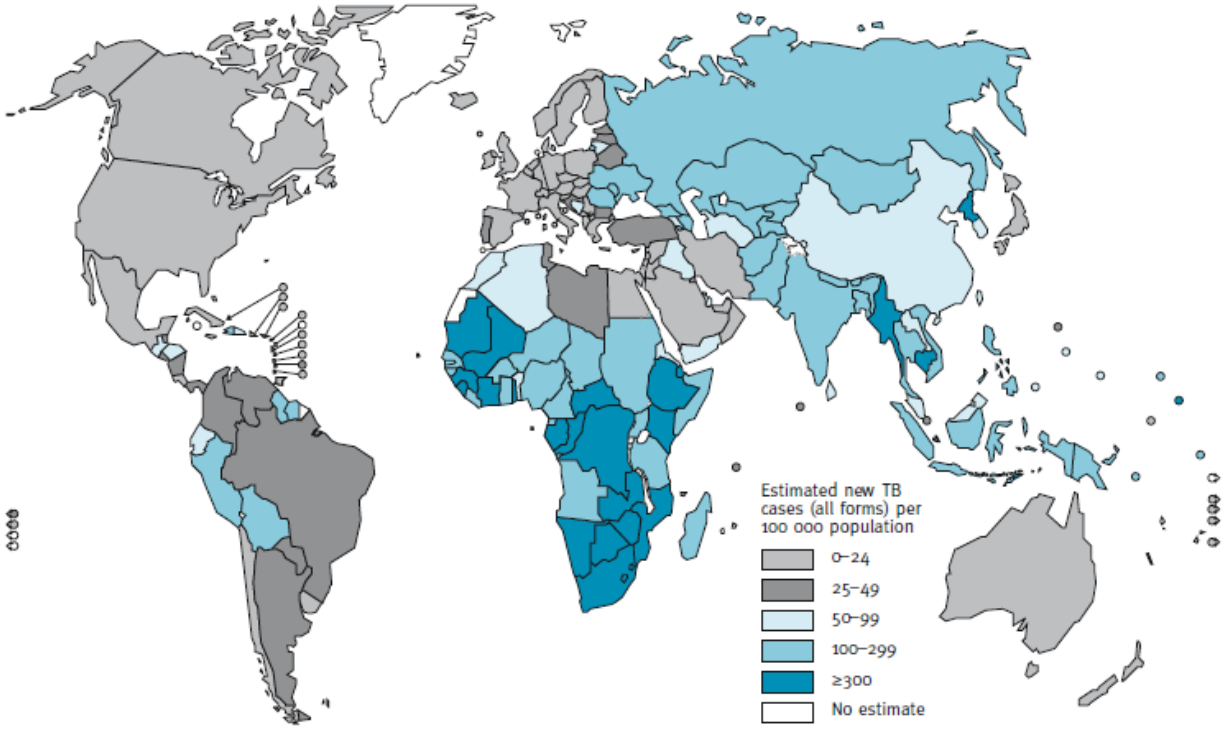


Figure 1. Taux d'incidence de la tuberculose en 2009. (WHO Report 2010)

La TB est la première cause de mortalité au sein des personnes VIH-positives et on considère que le VIH est le facteur qui contribue le plus à l'augmentation des cas de TB en Afrique. Si une personne infectée par la TB a un risque de 5-10% de développer la maladie pendant la durée de sa vie, une

personne VIH-positive infectée par la TB a un risque de 5-15% de la développer dans l'année qui suit (Jain and Dixit 2008).

Parmi les 9.4 millions de cas en 2009, 1.0-1.2 millions (11-13%) étaient VIH-positifs dont 80% en Afrique (Figure 2).

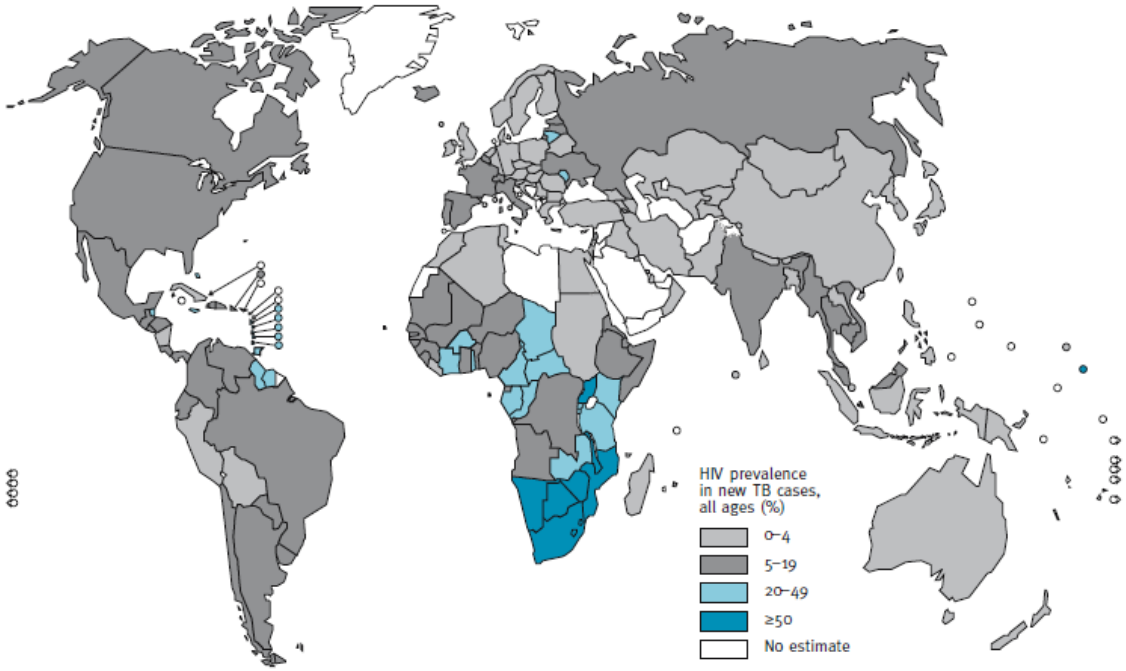


Figure 2. Prévalence du VIH dans les cas de tuberculose en 2009.

En 2009, on estime que le TB est responsable de 1.3 millions de morts pour les malades VIH-négatifs et de 0.4 millions pour les VIH-positifs, avec un total de 1.7 millions de personnes décédées à cause de la TB (26 morts pour 100 000 habitants).

2.2. Physiopathologie de la tuberculose

L'agent pathogène de la TB est *M. tuberculosis.* Un tiers de la population mondiale est porteuse de cette bactérie mais seulement 2 à 23% des personnes infectées développeront la maladie (Russell, Cardona et al. 2009).

La TB se transmet par inhalation de bacilles de *M. tuberculosis* vivants. Lorsqu'un malade atteint d'une TB pulmonaire tousse, il émet des microgouttes dans l'atmosphère qui contiennent des bactéries. Ces gouttes peuvent rester dans

l'air plusieurs heures. En considérant que la dose pour l'infection est de un à dix bacilles, la transmission de la maladie est donc très facile.

Une fois dans l'alvéole pulmonaire, les bactéries sont phagocytées par les macrophages (Figure 3).

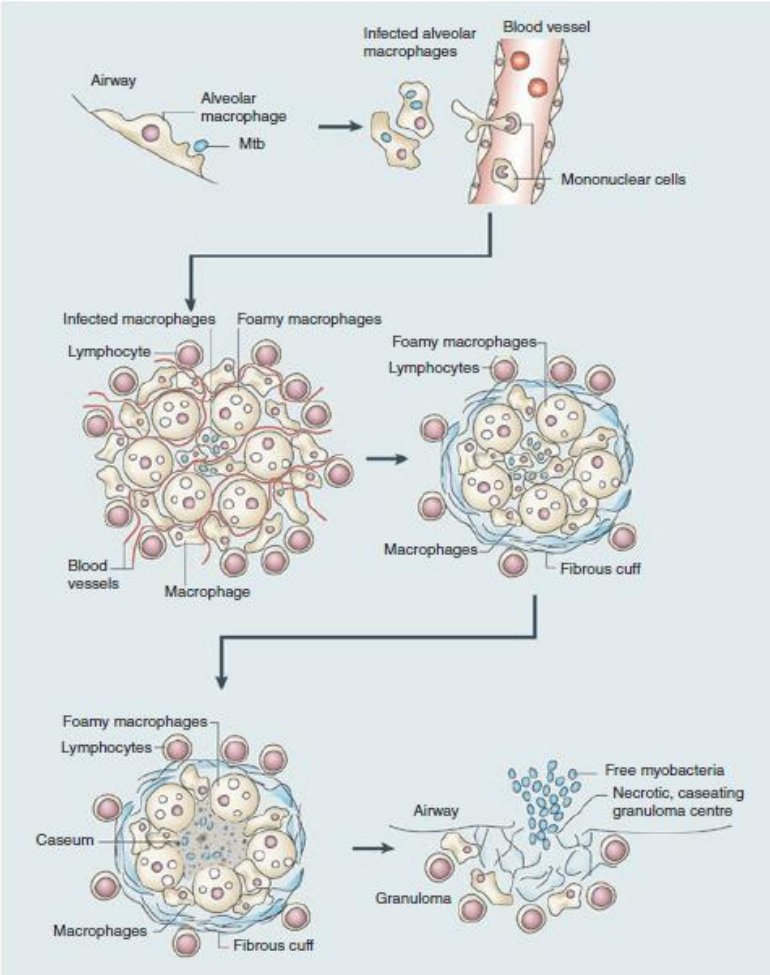


Figure 3. Schéma de l'infection par les bacilles tuberculeux dans le macrophage (Russell, Cardona et al. 2009).

Les macrophages sont essentiels pour phagocyter les particules toxiques et inflammatoires, les débris cellulaires et les cellules après apoptose. Mais ils sont aussi la première défense contre les microbes pathogènes qui sont tués grâce au pH interne des macrophages qui est très acide. *M. tuberculosis* fait partie des pathogènes (comme *Legionella*, *Brucella* et *Erlichia*) qui ont développé des stratégies pour survivre dans le macrophage (Rohde, Yates et al. 2007). Il est en effet capable de bloquer la fusion phagolysosomale et l'acidification du phagosome en maintenant le pH vacuolaire à 6.4 et en inhibant partiellement

l'activation des macrophages infectés liée à l'action de l'interféron-γ (Saunders and Britton 2007).

A l'intérieur du macrophage, les bactéries se divisent rapidement avec une croissance exponentielle, ce qui entraîne une réponse pro-inflammatoire durant laquelle le macrophage pénètre l'épithélium et recrute des cellules mononucléaires des vaisseaux sanguins adjacents. Ces monocytes forment le premier granulome. Le macrophage infecté se différencie en plusieurs types de macrophages : les cellules géantes multinucléaires, les cellules épithélioïdes et les macrophages spumeux (ou foamy). A ce stade, l'infection est confinée et les bactéries ont cessé de se reproduire. Le granulome mature développe une couche fibreuse entourée de lymphocytes qui englobe les macrophages. Quand l'infection progresse, on assiste à une accumulation du caséum dans le centre du granulome conduisant à une nécrose des tissus. Dans 90% des cas, le granulome se calcifie, et quelques bacilles survivent à l'intérieur dans un état stationnaire ; c'est ce qu'on appelle l'infection TB latente. L'infection est sous le contrôle du système immunitaire et elle peut rester dans cette phase pendant plusieurs années. Par contre, quand l'infection progresse, le caséum, centre nécrotique du granulome, se liquéfie et on assiste à une rupture du granulome et à la libération des bactéries. Les bacilles se multiplient à l'extérieur des cellules dans le caséum liquide et la population bactérienne devient très importante. Des dommages tissulaires provoquent une érosion bronchique et la formation d'une cavité (caverne). L'ouverture de cette cavité permet aux bacilles de disséminer via les voies aériennes dans les autres parties du poumon et dans l'environnement extérieur (Saunders and Britton 2007; Russell, Cardona et al. 2009).

La TB peut atteindre aussi d'autres organes. Parmi les localisations extra respiratoires, il faut citer l'atteinte osseuse et la méningite tuberculeuse.

2.3. Le traitement de la tuberculose

Le traitement recommandé par l'OMS pour une TB pulmonaire de patients HIV-négatifs est une quadrithérapie de 6 mois : 2 mois d'isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et éthambutol (Figure 4), suivis de 4 mois d'isoniazide et rifampicine avec une dose journalière ou trois administrations par semaine (WHO Guidelines 2009).

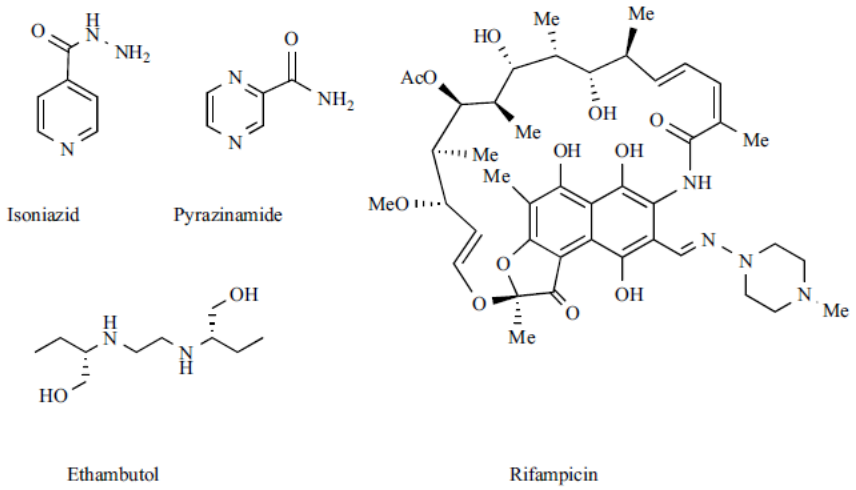


Figure 4. Structure chimique des antibiotiques de première ligne (Protopopova, Bogatcheva et al. 2007).

2.3.1. Antibiotiques de première ligne et leur mode d'action

L'isoniazide, la rifampicine, le pyrazinamide et l'éthambutol sont les antibiotiques de première ligne pour le traitement de la TB.

L'isoniazide est l'antibiotique clé de la polychimiothérapie. Il est connu pour sa grande activité bactéricide contre les bacilles en phase active de réplication dans les cavités pulmonaires et il est capable de réduire l'infection très rapidement. La rifampicine a une activité stérilisante, donc son activité est importante pour les bactéries en phase de dormance. Le pyrazinamide est la seule drogue active dans la vacuole du macrophage qui est à pH acide, et son introduction a permis de réduire la durée du traitement de 9 à 6 mois. Enfin, l'éthambutol est utilisé pour empêcher l'émergence des résistances (Gillespie 2002; Jain, Lamichhane et al. 2008).

Ces quatre antibiotiques se caractérisent par un mode d'action et une cible différents. La rifampicine fait une liaison covalente avec la sous-unité β de l'ARN polymerase (codée par le gène *rpoB*) et cause la mort de la bactérie par blocage transcriptionnel. L'isoniazide doit être activé dans la cellule par la catalase peroxidase (codée par le gène *katG*) et va inhiber l'activité de l'enoyl acyl carrier protein reductase (gène *inhA*) impliquée dans l'élongation des acides gras et dans la biosynthèse des acides mycoliques. Le pyrazinamide est aussi une prodrogue et nécessite une activation par la pyrazinamidase (codée par le gène *pncA*). Elle cause très probablement la mort bactérienne en supprimant le potentiel

énergétique transmembranaire et en inhibant le transport membranaire. Enfin, l'éthambutol cible l'arabinosyl transférase (codée par trois gènes organisés en un opéron *embCAB* de 10kb) et cause l'inhibition de la synthèse d'arabinogalactane (Loiez-Durocher, Vachee et al. 2000; Zhang, Wade et al. 2003; Zhang and Yew 2009).

2.4. La résistance aux antibiotiques

D'une façon générale, le traitement de la TB est difficile en raison de la résistance naturelle des mycobactéries à la plupart des antibiotiques usuels comme les β-lactamines, les macrolides, les cyclines, les sulfamides et les glycopeptides. A cela s'ajoute l'acquisition par mutation de résistances aux antibiotiques auxquels les mycobactéries sont naturellement sensibles (résistance acquise).

2.4.1. Resistance naturelle

La paroi des mycobactéries est la principale cause de cette multirésistance naturelle (Jarlier and Nikaido 1994). La perméabilité de la paroi de *M. tuberculosis* pour les β-lactamines est 100 fois plus faible que celle de *E. coli*. Cette imperméabilité naturelle est liée à la structure de la paroi, très dense et très riche en lipides, et à une affinité plus faible des β-lactamines pour les PLP (Protéines Liant les Pénicillines) (Jarlier, Gutmann et al. 1991). Cette très faible perméabilité de la paroi est associée à d'autres mécanismes de résistance naturelle : (1) production d'enzymes inactivatrices (Jarlier, Gutmann et al. 1991), (2) systèmes d'efflux (Braibant, Gilot et al. 2000), (3) moindre affinité pour la cible (Guillemin, Jarlier et al. 1998).

2.4.2. Resistance acquise

La résistance acquise est liée à des mutations dans les gènes chromosomiques qui codent soit pour les protéines cibles de certains antibiotiques, soit pour les enzymes impliquées dans l'activation des antibiotiques.

L'apparition de souches résistantes est due à plusieurs facteurs. Premièrement *M. tuberculosis* a des caractéristiques intrinsèques qui favorisent le développement de la résistance : son temps de génération long, sa capacité à

rester dans un état latent (dormance) et sa capacité à vivre dans des cavités très peu accessibles aux antibiotiques. Cela signifie que même avec une thérapie correcte, certaines populations de bactéries ne voient concrètement qu'une mono ou une bithérapie (Gillespie 2002).

Les taux de mutations génomiques spontanées chez les mycobactéries sont semblables à ceux décrits chez les autres bactéries : 10^{-8} mutations par réplication cellulaire (Werngren and Hoffner 2003). Le taux est différent selon l'antibiotique, le plus haut étant observé pour l'éthambutol (10^{-6}) et le plus bas pour la rifampicine (10^{-8}-10^{-9}).

La résistance acquise de *M. tuberculosis* aux antibiotiques est causée par une sélection de mutants résistants lors d'un traitement inadéquat (on parle alors de résistance secondaire). Cette sélection s'opère lorsque deux conditions sont réunies : une population bacillaire importante et un seul antibiotique actif. La première condition correspond le plus souvent aux TB pulmonaires excavées. La seconde est remplie lorsque le malade reçoit une monothérapie de principe (il ne prend qu'un seul des antibiotiques prescrits ou le médecin ne prescrit qu'un seul antibiotique) ou une monothérapie de fait (les bacilles sont résistants aux autres antibiotiques prescrits simultanément).

Après sélection de bacilles résistants, les malades peuvent contaminer leur entourage. Les nouveaux contaminés, s'ils deviennent malades, développent une TB à bacilles résistants (résistance primaire) présentant des profils de résistance identiques à ceux des bacilles du contaminateur.

2.4.3. MDR-TB et XDR-TB

La résistance aux antituberculeux est connue depuis la découverte des premiers antibiotiques. Après 60 ans d'utilisation, le nombre de cas de TB dans le monde est devenu très élevé, avec une augmentation constante des souches de *M. tuberculosis* résistantes responsables de TB dites MDR-TB et XDR-TB.

2.4.3.1. MDR-TB

Les souches dites « Multi-Drug Resistant » (MDR-TB) sont définies comme étant des souches de *M. tuberculosis* résistantes à au moins deux des quatre antibiotiques de première ligne, l'isoniazide et la rifampicine (Jain and Dixit 2008; WHO Report 2010). Les MDR-TB sont beaucoup plus difficiles à traiter, car elles

nécessitent l'utilisation d'autres antibiotiques (appelés antibiotiques de deuxième ligne), plus toxiques et moins efficaces, et la présence de personnel expérimenté et de matériels adaptés pour diagnostiquer et soigner les patients. La durée du traitement est aussi plus longue, pouvant aller jusqu'à deux ans.

On estime qu'en 2008, parmi l'ensemble des cas de TB diagnostiqués dans le monde, 440 000 cas étaient MDR-TB, entrainant le décès de 150 000 personnes (WHO Progress Report 2011). Parmi tous les nouveaux cas de TB, 3% étaient des MDR-TB mais dans certains pays, comme dans la Fédération russe, ce pourcentage pouvait atteindre 28%. Au niveau mondial, 86% de cas de MDR-TB sont localisés dans 27 pays, les 4 pays comptant le plus grand nombre de cas étant la Chine, l'Inde, la Fédération russe et l'Afrique du Sud (Figure 5).



Figure 5. Les 27 Pays avec le nombre majeur de cas de MDR-TB (WHO Progress Report 2011).

2.4.3.2. XDR-TB

En 2005 une nouvelle forme de TB résistante a été idéntifiée : Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR-TB). Il s'agit de souches de *M. tuberculosis* résistantes non seulement à l'isoniazide et à la rifampicine, mais aussi à des antibiotiques de deuxième ligne, les fluoroquinolones (ex. oflaxine, ciprofloxacine et levofloxacine – Tableau 1) et à au moins trois drogues de deuxième ligne injectables (ex. amikacine, kanamycine et capreomycine – Tableau 1) (Jain and Dixit 2008; WHO Report 2010).

Fin mars 2011, 69 pays avaient déclaré au moins un cas de XDR-TB. L'estimation donnée par l'OMS est le développement de 25 000 nouveaux cas de XDR-TB tous les ans dans le monde (WHO Progress Report 2011) (Figure 6).



Figure 6. Pays qui ont eu au moins un cas de XDR-TB avant fin mars 2011 (WHO Progress Report 2011).

L'association XDR-TB-VIH aggrave le problème de la multirésistance chez *M. tuberculosis*. Plusieurs études ont mis en évidence que les malades atteints de XDR-TB et VIH-positifs ont un pronostic de mortalité presque certain après quelques mois (taux supérieur à 95%) (Jain and Dixit 2008).

2.4.3.3. Traitement des cas de MDR-TB et XDR-TB

Les antibiotiques utilisables dans le cas d'une TB résistante sont les antibiotiques de première ligne encore actifs du groupe 1 de l'OMS, pyrazinamide, éthambutol, rifabutine, et les antibiotiques de deuxième ligne. Parmi ces derniers, le groupe 2 avec les agents injectables (aminosides/peptides cycliques), le groupe 3 avec les fluoroquinolones, le groupe 4 avec les agents bactériostatiques (éthionamide, protionamide, acide para-amino-salicylique, cyclosérine et térizidone) et le groupe 5 avec la clofazimine, le linézolide, l'amoxicilline+acide clavulanique, le thiacétazone, l'imipénème/cilastatine, la clarithromycine et de haute dose d'isoniazide pour les souches résistantes à bas niveau (Tableau 1).

Groupe	Drogue
Groupe 1 Première ligne – composés oraux	pyrazinamide éthambutol rifabutine
Groupe 2 Composés injectables (aminosides, peptides cycliques)	kanamycine amikacine capreomycine streptomycine
Groupe 3 Fluoroquinolones	lévofloxacine moxifloxacine ofloxacine
Groupe 4 Deuxième ligne – composés bactériostatiques oraux	acide para-amino-salicylique cyclosérine térizidone éthionamide protionamide
Groupe 5 Composés dont l'efficacité dans le traitement de la TB n'est pas clairement définie	clofazimine linéozide amoxicilline+clavulanate thioacétazone imipénème+cilastatine dose élevée d'isoniazide clarithromycine

Tableau 1. Groupes d'antibiotiques utilisés pour le traitement de la MDR-TB selon l'OMS. Adaptation de (WHO Progress Report 2011)

Le traitement pour les MDR/XDR-TB est moins efficace, plus toxique, plus couteux et plus long par rapport au traitement pour les souches sensibles (il est recommandé de continuer le traitement pendant au moins 18 mois après la négativation de la culture) (WHO Progress Report 2011). Même dans des conditions optimales, le pourcentage de guérison est bien inférieur à celui des cas de TB à bacilles sensibles traités par quadrithérapie puis bithérapie pendant 6 mois : il fluctue entre 46% et 75% des cas (Espinal, Kim et al. 2000).

3. Les nouveaux antibiotiques et le TMC207

La streptomycine est la première drogue avec une activité sur *M. tuberculosis* à avoir été découverte. Sa découverte en 1944 a été une étape cruciale de l'histoire de la médecine et a valu à son auteur Selman Waksman (Figure 7) le prix Nobel de médecine en 1952 (Gillespie 2002).

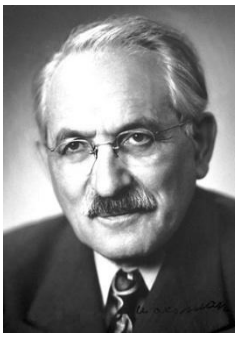


Figure 7. Selman Waksman, prix Nobel en 1952.

Si on fait exception de la rifampentine, le dernier antituberculeux parmi les composés actuellement utilisés a été identifié dans les années 60s, le traitement isoniazide-rifampicine-pyrazinamide-éthambutol étant utilisé depuis les années 70s (Jain, Lamichhane et al. 2008). La découverte de nouvelles drogues pour traiter la TB est donc une étape cruciale pour gérer l'émergence des souches résistantes et pour pouvoir soigner les malades.

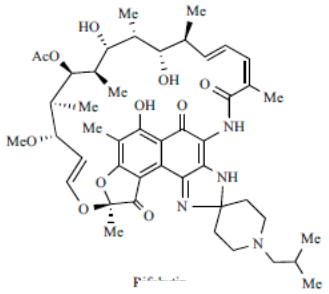
Les caractéristiques de l'antibiotique idéal pour lutter contre la TB sont (Cole and Alzari 2005; Barry and O'Connor 2007; Cole and Alzari 2007; Protopopova, Bogatcheva et al. 2007; Spigelman 2007; Marigot-Outtandy and Perronne 2009) :

- une activité spécifique sur *M. tuberculosis,* ou au moins sur les mycobactéries
- une activité sur les souches sensibles et résistantes de *M. tuberculosis*
- un nouveau mécanisme d'action et une nouvelle cible
- une éradication complète de la bactérie via une activité sur les bacilles en phase de dormance
- une forte activité permettant de réduire la durée du traitement
- pas d'activité antagoniste avec les autres antituberculeux mais une activité synergique ou additive
- une action bactéricide
- une demi-vie longue
- pas d'interaction avec les antirétroviraux utilisés dans le traitement contre le VIH
- une administration par voie orale
- des coûts de production faibles.

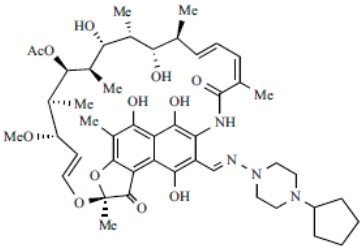
3.1. Les nouveaux antituberculeux

Aujourd'hui plusieurs molécules sont en phase de développement clinique (Figure 8 et Tableau 2). Les plus prometteuses sont les nouvelles rifamycines, les fluoroquinolones, les dérivés nitroimidazolés, la diamine SQ109, le pyrrole LL 3858, les oxazolidinones et la diarylquinoline TMC207 (Cole and Alzari 2005; Barry and O'Connor 2007; Cole and Alzari 2007; Protopopova, Bogatcheva et al. 2007; Spigelman 2007; Marigot-Outtandy and Perronne 2009).

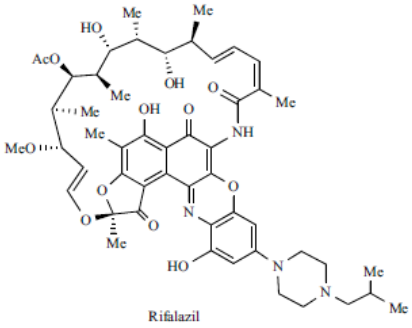
Nouvelles rifamycines



Rifabutine

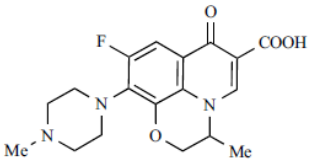


Rifapentine

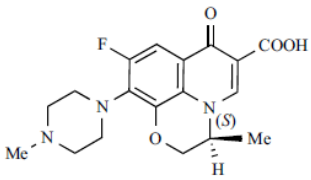


Rifalazil

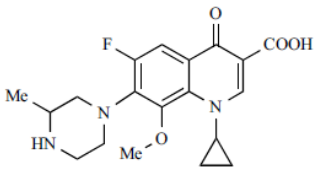
Fluoroquinolones



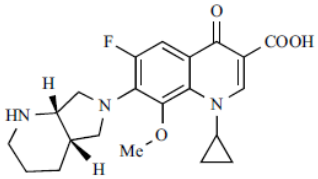
Ofloxacine



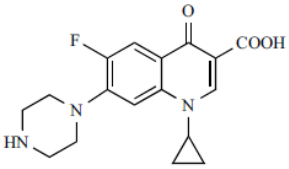
Levofloxacine



Gatifloxacine

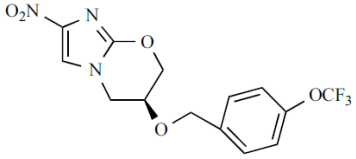


Moxifloxacine

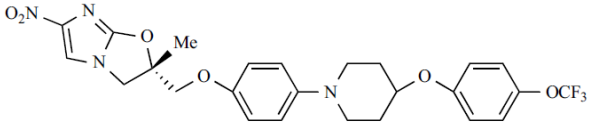


Ciprofloxacine

Dérivés nitroimidazolés

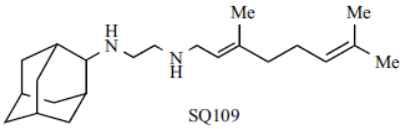


PA-824

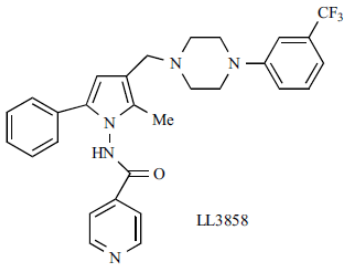


OPC-67683

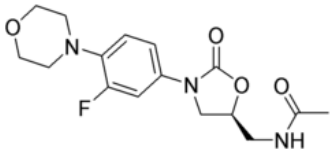
Diamine SQ109



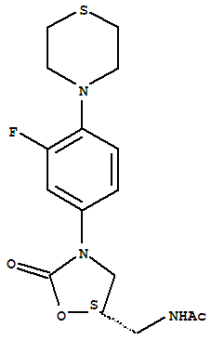
LL3858



Oxazolidinones



Linézolide



PNU-100480

Figure 8. Structure chimique de quelques nouveaux antituberculeux

Classe d'antibiotique	Nom	Mécanisme d'action	Phase clinique de développement (Tableau 3)
Nouvelle rifamycines	Rifalazil Rifambutine Rifapentine	Inhibition ARN polymerase	II/III
Fluoroquinolones	Levofloxacine Gatifloxacine Moxifloxacine Ciprofloxacine Ofloxacine	Inhibition ADN gyrase	II/III
Dérivés nitroimidazolés	PA-824 OPC-67683	Inhibition de la synthèse des acides mycoliques	II
Analogues de l'éthambutol	SQ109	Inhibition de la synthèse de la paroi	I
Pyrroles	LL3858	Inconnu	I
Oxazolidinones	Linézoide PNU-100480	Inhibition du ribosome	II
Diarylquinolines	TMC207	Inhibition de l'ATP synthase	II

Tableau 2. Tableau récapitulatif des nouveaux antituberculeux avec leur mécanisme d'action et leur phase clinique de développement.

PHASE CLINIQUE	NOMBRE PERSONNES	OBJECTIFS
phase pré-clinique	0	Etude *in vitro* et *in vivo* chez l'animal pour déterminer la dose maximale tolérée.
phase 0 (pas toujours réalisée)	de 10 à 15	Evaluation préliminaire de la pharmacodynamique et de pharmacocinétique via des traitements avec une dose réduite et de courte durée.
phase I	de 20 à 80	Evaluation de la tolérance, de la toxicité et de l'absence d'effets secondaires chez des volontaires sains : permet d'étudier la cinétique et le métabolisme chez l'homme.
phase II IIa	de 100 à 200	Estimation de l'efficacité.
IIb	de 100 à plus que 300	Détermination de la dose thérapeutique.
phase III	plusieurs milliers	Comparaison du traitement à un traitement de référence ou à un placebo.
phase IV ou post-marketing	plusieurs dizaine de milliers	Suivi du traitement sur le long terme après son autorisation de mise sur le marché afin de dépister les effets secondaires rares ou les complications tardives.

Tableau 3. Les phases cliniques. Seulement 5 à 10% des molécules qui passent en phase clinique sont finalement mises sur le marché.

3.2. Le TMC207

En 2004 un travail effectué en collaboration avec notre laboratoire a permis l'identification d'une nouvelle famille d'antituberculeux appelée diarylquinoline (Andries, Verhasselt et al. 2005) à partir d'un screening de molécules actives contre *M. smegmatis*. Dans cette famille, 20 molécules ont montré une forte activité bactéricide sur *M. tuberculosis in vitro*. Pour trois d'entre elles, l'activité anti-mycobactériennne a été démontrée *in vivo*, la plus active étant le R207910 (appelée maintenant TMC207) (Figure 9).

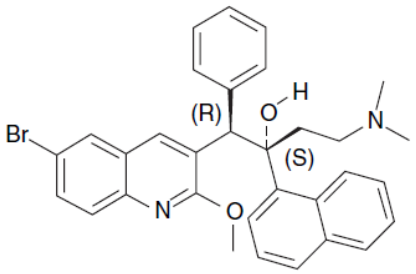


Figure 9. Configuration absolue du TMC207. La forme active est l'isomère R,S (Andries, Verhasselt et al. 2005).

Le TMC207 a un spectre d'action unique et spécifique aux mycobactéries. Les concentrations minimales inhibitrices (CMIs) pour *M. tuberculosis* varient de 0.03 µg/ml à 0.12 µg/ml (en comparaison, 0.5 µg/ml pour la rifampicine et 0.12 µg/ml pour l'isoniazide). Il a une forte activité sur les souches sensibles comme sur les souches résistantes aux antituberculeux actuels. Il est aussi actif sur d'autres mycobactéries pathogènes comme *M. bovis* et *M. ulcerans*, ainsi que sur la plupart des mycobactéries atypiques (Tableau 4).

Espèces mycobactériennes	Nombre de souches	CMI chez les différentes souches (µg/ml)	CMI moyenne (µg/ml)
M. tuberculosis, H37Rv	1	-	0.030
M. tuberculosis, souches cliniques sensibles	6	0.030-0.0120	0.060
M. tuberculosis résistant à l'isoniazide	7	0.003-0.060	0.010
M. tuberculosis résistant à la rifampicine	1	-	0.030
M. tuberculosis résistant à l'isoniazide et à la rifampicine	2	0.030-0.030	0.030
M. tuberculosis résistant à l'isoniazide et à la streptomycine	1	-	0.010
M. tuberculosis résistant à l'éthambutol	1	-	0.010
M. tuberculosis résistant à la pyrazinamide	1	-	0.030
M. tuberculosis résistant aux fluoroquinolones	2	0.060-0.0120	0.090
M. bovis	1	-	0.003
M. ulcerans	1	-	0.500
M. avium/M. intracellulare (MAC)	7	0.007-0.010	0.010
M. kansasii	1	-	0.003
M. marinum	1	-	0.003
M. fortuitum	5	0.007-0.010	0.010
M. abscessus	1	-	0.250
M. smegmatis	7	0.003-0.010	0.007

Tableau 4. CMIs du TMC207 pour différentes espèces mycobactériennes (Andries, Verhasselt et al. 2005).

Le TMC207 n'a pas d'activité sur les autres bactéries. Sa CMI pour *Corynebacterium* et *Helicobacter pylori* est de 4.0 µg/ml. Pour *E. coli*, elle *est* >32 µg/ml (Tableau 5).

Bactérie	CMI (µg/ml)
Corynebacterium jeikeium	4
Corynebacterium urealyricum	4
Helicobacter pylori	4
Nocardia asteroides	>16
Nocardia fareinica	>16
Escherichia coli	>32
Haemophilus influenzae	>32
Streptococcus pneumoniae	>32
Staphylococcus aureus	>32

Tableau 5. CMIs du TMC207 pour différentes espèces bactériennes (Andries, Verhasselt et al. 2005).

3.2.1. Identification de la cible du TMC207

L'identification de la cible du TMC207 a été faite par notre équipe en collaboration avec Andries et collègues (Andries, Verhasselt et al. 2005). Pour cela, des mutants résistants au TMC207 issu de deux espèces, *M. tuberculosis* et *M. smegmatis,* ont été sélectionné *in vitro*. Les génomes de ces mutants résistants ont été entièrement séquencés et comparés aux génomes des souches sauvages. Les seules mutations identifiées dans les souches résistantes sont deux mutations ponctuelles (une pour chaque espèce) dans le gène *atpE* qui code pour la sous-unité c de l'ATP synthase. Les modifications en acides aminés correspondantes étaient A63P dans la sous-unité c de *M. tuberculosis* et D32V dans celle de *M. smegmatis* (Figure 10). L'ATP synthase qui est l'enzyme responsable de la synthèse d'ATP cellulaire a donc été proposée pour être la cible du TMC207.

Suite à ce travail préliminaire, d'autres travaux ont été menés afin de caractériser la cible du TMC207. D'autres mutations ont été identifiées dans la sous-unité c de l'ATP synthase à partir d'autres mutants résistants au TMC207 sélectionnés *in vitro*. Les mutations D28G, E61D, A63P et I66M (Figure 10) ont été identifiées dans les mutants de *M. tuberculosis* (Andries, Verhasselt et al. 2005; Petrella, Cambau et al. 2006; Huitric, Verhasselt et al. 2010).

La sous-unité c de l'ATP synthase est extrêmement conservée parmi les espèces mycobactériennes (Figure 10) et tous les résidus impliqués dans la

résistance au TMC207 touchent des résidus conservés dans les différentes espèces, à l'exception du résidu en position 63 (Figure 10). L'amplification et le séquençage du gène *atpE* de *M. xenopi* par notre équipe a montré la présence d'un polymorphisme à cette position par rapport aux autres espèces mycobactériennes (Figure 10) (Petrella, Cambau et al. 2006). Cette modification d'une Ala en Met à la position 63 existe aussi dans deux autres espèces, *M. novocastrense* et *M. shimoidei* (Huitric, Verhasselt et al. 2007). Or, ces trois espèces, *M. xenopi*, *M. novocastrense* et *M. shimoidei* sont les seules espèces mycobactériennes naturellement résistantes au TMC207, le polymorphisme Ala63M pouvant expliquer ce phénomène.

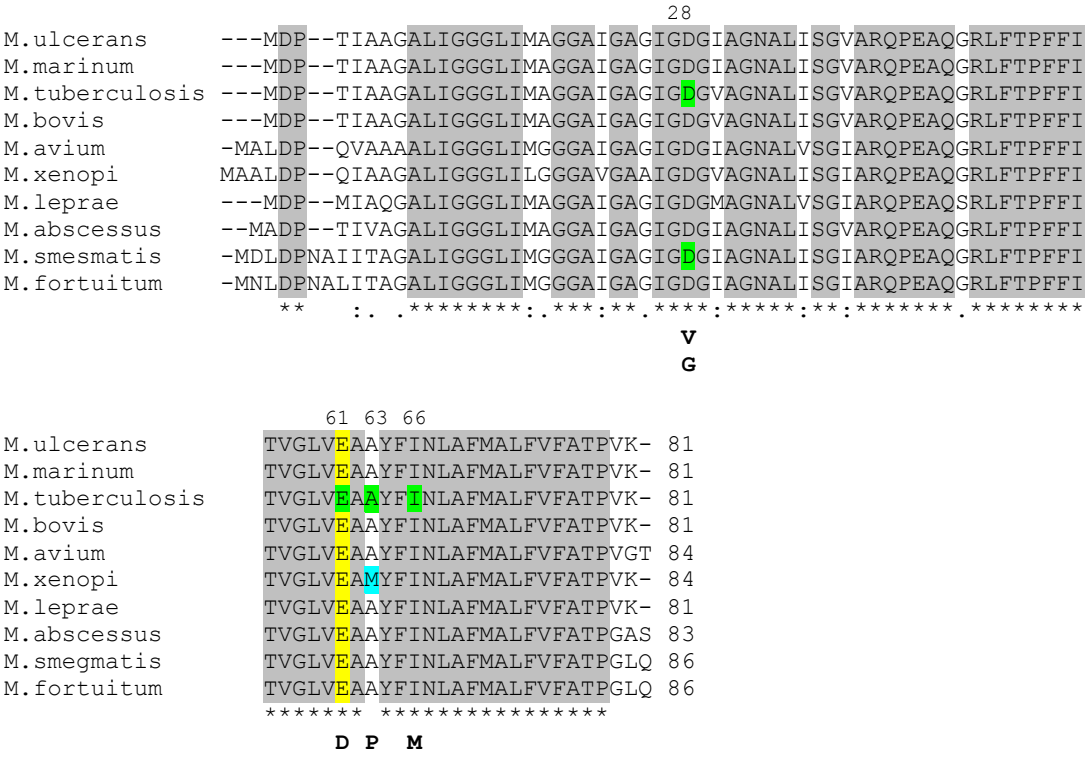


Figure 10. Alignement des séquences des sous-unités c de l'ATP synthase de différentes espèces mycobactériennes. L'alignement a été fait avec ClustalW2. En gris les acides aminés conservés. En jaune le résidu Glu hautement conservé et important pour l'activité de l'ATP synthase. En vert les acides aminés impliqués dans la résistance au TMC207 avec en gras la mutation correspondante (numérotation de *M. tuberculosis*). En bleu le polymorphisme présent chez les espèces naturellement résistantes au TMC207.

Ces différents travaux confirment que la sous-unité c de l'ATP synthase est la cible du TMC207, mais des travaux complémentaires sont nécessaires pour comprendre le mode d'interaction de la drogue sur la protéine. Des études biochimiques complémentaires ont été faites par l'équipe de Koul A. et al. (Koul,

Dendouga et al. 2007) qui a démontré que le niveau d'ATP cellulaire chez une souche sauvage de *M. tuberculosis* diminue en fonction de la concentration de TMC207 et que, par contre, dans les souches mutées de *M. tuberculosis* résistantes au TMC207, la drogue n'influe pas sur le niveau d'ATP cellulaire. Des tests d'affinité ont également été faits avec un analogue du TMC207 lié sur une résine. Cette résine a été mise en contact avec un extrait protéique total de *M. smegmatis* et il a été montré qu'une seule protéine, l'ATP synthase, liait l'antibiotique. Enfin, un test BIAcore a prouvé que la sous-unité c sauvage de l'ATP synthase de *M. tuberculosis* a une forte affinité pour le TMC207, alors que la sous-unité c mutée d'une souche de *M. tuberculosis* résistante au TMC207 a une affinité nettement réduite.

Le TMC207 est donc le premier antituberculeux à avoir comme cible l'ATP synthase et, d'une manière plus générale, une enzyme du système énergétique cellulaire.

3.2.2. Essais cliniques

La découverte du TMC207 est une étape cruciale dans le développement de nouveau antituberculeux en raison des caractéristiques uniques de cette molécule (Cohen 2004; Ashraf 2005; Cole and Alzari 2005) :

- une activité spécifique sur les mycobactéries
- une nouvelle cible (l'ATP synthase) permettant à la molécule d'être active contre les souches sensibles et contre les souches résistantes de *M. tuberculosis*
- une activité sur les bactéries en phase non-réplicative
- une capacité de réduction de la durée du traitement de la TB
- une activité très faible sur l'ATP synthase eucaryote ; l'inhibition de l'ATP synthase mitochondriale se fait avec une quantité de drogue 20 000 fois supérieure à celle qui permet l'inhibition de l'ATP synthase de *M. smegmatis* (Haagsma, Abdillahi-Ibrahim et al. 2009).

3.2.2.1. Etudes chez la souris

Les études réalisées chez la souris ont permis d'établir les caractéristiques essentielles du TMC207 dans le cadre du traitement de la TB. Administré en monothérapie le TMC207 est plus actif que n'importe quel drogue en

monothérapie et il est aussi efficace que la trithérapie rifampicine-isoniazide-pyrazinamide (Andries, Verhasselt et al. 2005; Ibrahim, Andries et al. 2007).

L'association avec les antibiotiques de première ligne et de deuxième ligne a donné des résultats très encourageants, et il a été montré que la durée du traitement peut être drastiquement réduite grâce au TMC207 (Lounis, Veziris et al. 2006; Ibrahim, Andries et al. 2007; Ibrahim, Truffot-Pernot et al. 2009).

L'effet bactéricide du TMC207 est modeste dans la première semaine, mais il devient important dans les trois semaines successives (Lounis, Gevers et al. 2008). Les bactéries ont probablement une réserve d'ATP dans la cellule qui fait que le TMC207 n'est actif qu'après 4-7 jours de son utilisation.

Il existe une synergie entre le TMC207 et le pyrazinamide, ainsi qu'une interaction avec la rifampicine (Andries, Verhasselt et al. 2005; Ibrahim, Andries et al. 2007).

3.2.2.2. Etudes chez le cochon d'Inde

Le cochon d'Inde a été utilisé comme deuxième modèle animal pour étudier l'activité du TMC207. Le cochon d'Inde a l'avantage, par rapport à la souris, de développer une TB très similaire à celle de l'homme avec la formation de granulomes. Dans ce modèle, le TMC207 a montré une capacité stérilisatrice (Lenaerts, Hoff et al. 2007).

3.2.2.3. Etudes chez l'homme

Les phases clinique I, 81 volontaires sains, et II, monothérapie pendant 7 jours chez des patients malades de TB jamais traités, n'ont pas mis en évidence d'effets adverses du TMC207. Si l'activité bactéricide initiale du TMC207 est plus faible que celle de l'isoniazide et de la rifampicine, elle augmente progressivement pour devenir identique à celle de deux autres drogues de première ligne aux jours 4-7. Le TMC207 a été considéré sûr et bien toléré, sans effets collatéraux importants (Andries, Verhasselt et al. 2005; Rustomjee, Diacon et al. 2008). Une étude avec des patients atteints de MDR-TB jamais traités a également donné des résultats très encourageants : le TMC207 n'a pas causé d'effets secondaires graves, il a été bien toléré, et, ajouté au traitement standard pour les MDR-TB, la négativation des cultures est plus rapide que celle obtenue pour le traitement standard (Diacon, Pym et al. 2009).

Le TMC207 est aujourd'hui en autorisation temporaine d'utilisation chez des patients sur lesquels aucun des autres traitements antituberculeux ne fonctionne.

Il est également envisagé de le tester en l'associant à des antirétroviraux afin de déterminer si le TMC207 peut être utilisé chez les patients VIH-positifs.

3.2.3. Le TMC207 et les bactéries en phase non-réplicative

La durée très longue du traitement de la TB est due à la présence d'une sous-population de bacilles en hypoxie qui sont capables de survivre dans un état de croissance lente, voire nulle, pendant de longues périodes, et qui sont donc difficiles à éliminer par les antituberculeux classiques. La rifampicine et la moxifloxacine par exemple ont une activité 50 fois moins forte contre les bactéries non-réplicatives, et l'isoniazide et l'éthambutol sont complètement inactifs.

Toute la chaîne respiratoire des mycobactéries, y compris l'ATP synthase, est sous-régulée pendant la phase non-réplicative de dormance (Rao, Alonso et al. 2008; Bald and Koul 2010). Le niveau d'ATP cellulaire est inferieur de 90% par rapport aux bactéries en phase active de réplication, mais l'ATP est toujours indispensable à la bactérie et l'ATP synthase reste active et fonctionnelle (Koul, Vranckx et al. 2008). La synthèse *de novo* de l'ATP est nécessaire afin de garder la bactérie vivante, les bacilles non-réplicatifs sont donc hautement vulnérables à l'inhibition de l'ATP synthase par le TMC207, même à des concentrations basses en antibiotique (Koul, Vranckx et al. 2008; Gengenbacher, Rao et al. 2010).

Le TMC207 est pour le moment la seule drogue capable de tuer avec la même efficacité les bacilles en phase active de réplication et les bacilles en état de dormance (Koul, Vranckx et al. 2008).

3.2.4. Etudes *in vivo* sur les autres mycobactéries pathogènes

M. leprae est la bactérie responsable de la lèpre chez l'homme. Cette maladie touche les nerfs périphériques, la peau et les muqueuses, et provoque des infirmités sévères. Les régions du monde les plus touchées par la lèpre sont l'Asie du Sud-est, l'Amérique du Sud et l'Afrique. Le TMC207 a montré une activité bactéricide contre *M. leprae,* et dans le modèle murin, une seule dose est capable de tuer 95% des bactéries (Ji, Chauffour et al. 2006).

L'ulcère de Buruli est une maladie de la peau rencontrée dans plus de 30 pays du monde, surtout tropicaux. C'est la troisième maladie à mycobactéries après la TB et la lèpre. Elle est causée par *M. ulcerans*. L'infection entraîne une destruction étendue de la peau et des tissus mous avec la formation d'ulcères de grande dimension, se localisant en général sur la jambe ou le bras. En l'absence de traitement précoce, la maladie peut laisser des incapacités fonctionnelles durables. Dans le modèle murin, le TMC207 est bactéricide contre *M. ulcerans*, et en association avec la rifampicine, il pourrait devenir un traitement possible contre l'ulcère de Buruli (Ji, Lefrancois et al. 2006).

M. avium est une mycobactérie atypique, pathogène opportuniste chez les patients atteints de SIDA et associée à la maladie de Chron. Le TMC207 a une forte activité *in vitro* contre *M. avium*, mais chez la souris, il a un effet bactériostatique et non bactéricide (Lounis, Gevers et al. 2009).

4. ATP synthase

Pour survivre, une cellule a constamment besoin d'énergie. L'adénosine triphosphate (ATP) est la source d'énergie universelle pour toutes les cellules vivantes utilisée dans de nombreuses réactions métaboliques, de biosynthèse, de transport membranaire, de régulation etc. L'ATP utilisé est transformé en adénosine diphosphate (ADP) et phosphate inorganique (Pi). On estime que le corps humain nécessite en moyenne 50 kg d'ATP par jour ! Le niveau d'ATP dans la cellule doit toujours être élevé et constant et la grande majorité de cet ATP est produite par une enzyme ubiquitaire : la F_1F_O ATP synthase (ou F-ATPase). Cette enzyme est présente chez tous les organismes vivants, à l'exception des archées qui utilisent une enzyme similaire (A_1A_O ATP synthase). C'est probablement la protéine la plus ubiquitaire sur terre. Sa structure et son mécanisme sont très conservés dans les différents organismes vivants et il existe seulement des caractéristiques spécifiques pour les différentes enzymes liées à l'adaptation environnementale (von Ballmoos, Wiedenmann et al. 2009), (von Ballmoos, Cook et al. 2008). L'étude de l'ATP synthase et de son fonctionnement a permis à Peter Mitchell d'obtenir le prix Nobel de Biochimie en 1987, et à Paul D. Boyer et à John E. Walker en 1997 (Figure 11).

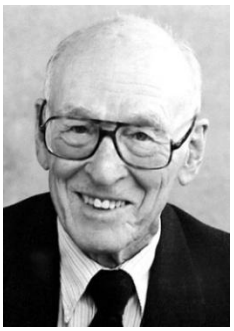
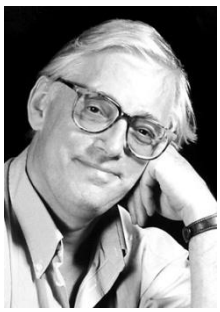
A  B  C 

Figure 11. (A) Paul D. Boyer, (B) Jonh E. Walker, (C) Peter Mitchell

4.1. La famille des ATPases

La famille des ATPases contient les F-, A-, V- P-, et E-ATPases. Il s'agit de complexes protéiques composés de plusieurs sous-unités et ancrés à la membrane. Leur mécanisme catalytique est très similaire : elles couplent le transport d'ions à travers la membrane à l'hydrolyse/synthèse d'ATP. Leur structure générale a une forme globale de « champignon », avec un domaine catalytique hydrophile qui lie les nucléotides et un domaine transmembranaire qui agit comme pompe/canal ionique (Muench, Trinick et al. 2011).

Les F-ATPases sont communément appelées ATP synthases, la lettre "F" vient de "phosphorylation **F**actor". Elles sont présentes chez les bactéries, les mitochondries et les chloroplastes. Leur fonction principale, comme l'indique leur nom, est la synthèse d'ATP, mais elles peuvent aussi hydrolyser l'ATP dans certaines conditions. Le principal ion transporté est l'ion H^+, mais il existe aussi des ATP synthases à Na^+ chez quelques bactéries anaérobies (Hicks, Liu et al. 2010).

Les V-ATPases ont été initialement trouvées dans les **V**acuoles eucaryotes mais elles sont aussi présentes dans la membrane plasmique bactérienne. Ce sont des pompes à H^+ ou à Na^+ ATP-dépendant et leur fonction est de permettre l'acidification de la vacuole ou du compartiment extracellulaire par l'hydrolyse de l'ATP. Les enzyme de la famille des V-ATPases sont constituées d'un nombre plus important de sous-unités par rapport aux F-ATPases et, chez certaines bactéries, elles peuvent également permettre la synthèse d'ATP (Nakanishi-Matsui, Sekiya et al. 2010).

Les A-ATPases sont présentes seulement chez les **A**rchées. Leur fonction est celle des F-ATPases, c'est-à-dire de synthétiser l'ATP, mais leur structure et la

séquence de leurs sous-unités sont plus similaires aux V-ATPases bactériennes. Comme ces dernières, les A-ATPases sont constituées d'un nombre plus important de sous-unités que les F-ATPases (Vonck, Pisa et al. 2009).

Les F-, les A-, et chez certaines espèces les V-ATPases, sont les seuls membres de la famille des ATPases à avoir la capacité de synthétiser l'ATP (Figure 12).

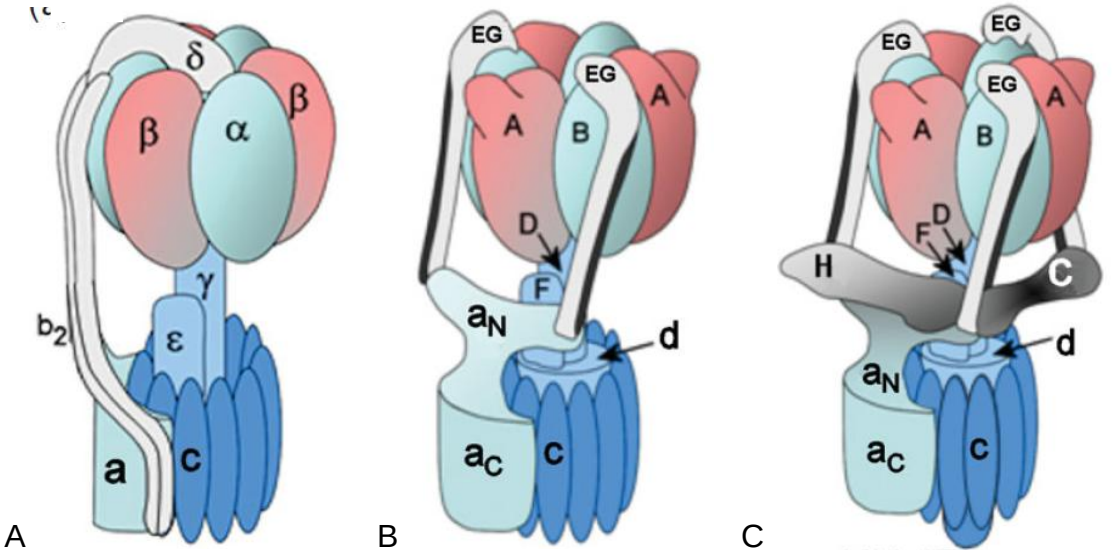


Figure 12. Organisation en sous-unités des F-, A- et V-ATPases. (A) F-ATPase bactérienne, (B) A-ATPase, (C) V-ATPase vacuolaire (Muench, Trinick et al. 2011).

Les P-ATPases pompent une grande variété d'ions à travers la membrane des bactéries, des archées, des eucaryotes et des organites. Leur transport est spécifique pour un type d'ion : H^+, Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ag^+, Zn^{2+}, Co^{2+}, Pb^{2+}, Mn^{2+}, Cd^{2+}, Cu^+ ou Cu^{2+}. Pendant l'hydrolyse de l'ATP il y a la formation d'un intermédiaire **P**hosphorylé de l'enzyme (Inesi 2011), d'où le nom de P-ATPase.

Les E-ATPases hydrolysent les nucléotides **E**xtracellulaires tri et/ou biphosphates. Leur substrat n'est pas seulement l'ATP et l'ADP mais elles peuvent aussi hydrolyser d'autres NTPs et NDPs, même si les substrats pour lesquels elles ont le plus d'affinité sont l'ATP, l'ADP et l'UTP.

4.2. L'ATP synthase : généralités et place dans la cellule

Paul D. Boyer définit l'ATP synthase comme « une machine moléculaire splendide ». Il s'agit d'une enzyme très complexe, avec au moins 20 sous-unités parmi lesquelles plus de la moitié sont membranaires. Cette enzyme unique, essentielle à la vie, est étudiée depuis longtemps mais pose encore un nombre important de questions non résolues.

Le mécanisme unique de l'ATP synthase est l'utilisation du transfert de protons ou d'ions Na^+ à travers la membrane selon leur gradient électrochimique, FPM (Force Proton Motrice) ou FSM (Force Sodium Motrice), afin de produire de l'ATP. Ce mécanisme, proposé par Peter Mitchell en 1961 et appelé « couplage chimio-osmotique » (Mitchell 1961), implique la présence d'une membrane imperméable aux ions et constamment énergisée.

L'activité de l'ATP synthase dans la cellule se fait en collaboration avec des pompes à H^+ ou à Na^+ (Figure 13), qui permettent de maintenir le gradient électrochimique (Cross and Taiz 1990). Chez les organismes hétérotrophes, les enzymes de la chaîne respiratoire réduisent le NADH et le succinate et utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électrons ; l'énergie libérée est convertie en gradient protonique. Les chloroplastes et les bactéries phototrophiques utilisent l'énergie lumineuse pour produire le gradient protonique à travers la membrane tandis que les organismes anaérobies le couplent aux réactions de décarboxylation. Ce gradient de H^+ ou de Na^+ fournit l'énergie nécessaire à l'ATP synthase pour synthétiser l'ATP à partir d'ADP et Pi (von Ballmoos, Wiedenmann et al. 2009).

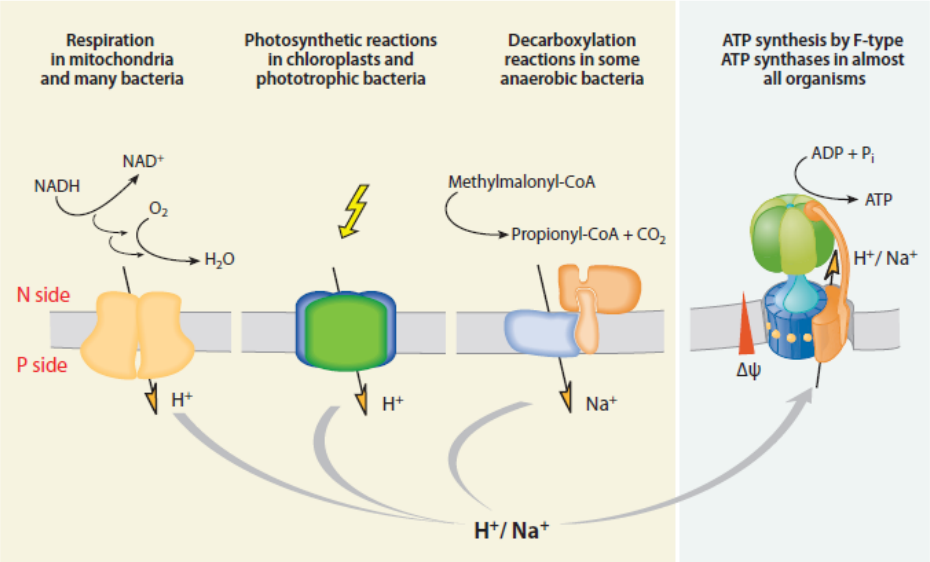


Figure 13. Cycle des ions à travers la membrane biologique afin de produire l'ATP. Le « N side » correspond à la partie chargée négativement de la membrane et le « P side » à la partie chargée positivement (von Ballmoos, Wiedenmann et al. 2009).

L'ATP synthase est un nanomoteur qui se trouve dans la membrane plasmique des bactéries, dans la membrane thylacoïdale des chloroplastes et dans la membrane interne des mitochondries. Elle est probablement le plus petit moteur au monde, avec une vitesse de rotation d'environ 6 000 révolutions par minute. Elle est composée de deux domaines, un domaine soluble F_1 et un domaine membranaire F_O (la lettre « O » est pour « oligomycin binding domain »). Chaque domaine opère comme un moteur rotatif moléculaire pouvant tourner dans les deux sens et échangeant l'énergie avec son partenaire. Le domaine F_1 est composé des sous-unités $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ et le domaine F_O dans sa forme la plus simple chez les bactéries est composé des sous-unités $ab_2c_{10\text{-}15}$, le nombre de sous-unités c étant variable en fonction de l'organisme (Figure 14). F_O transforme le gradient électrochimique de H^+ or Na^+ en énergie qui permet la rotation de F_1 et la production d'ATP. Il faut préciser ici que la FPM (ou la FSM) est nécessaire à d'autres activités membranaires, comme les transports secondaires et la rotation des flagelles. Si le gradient ionique diminue, l'ATP synthase est ainsi capable d'inverser son activité et, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, transporter les ions contre gradient afin de maintenir la membrane énergisée.

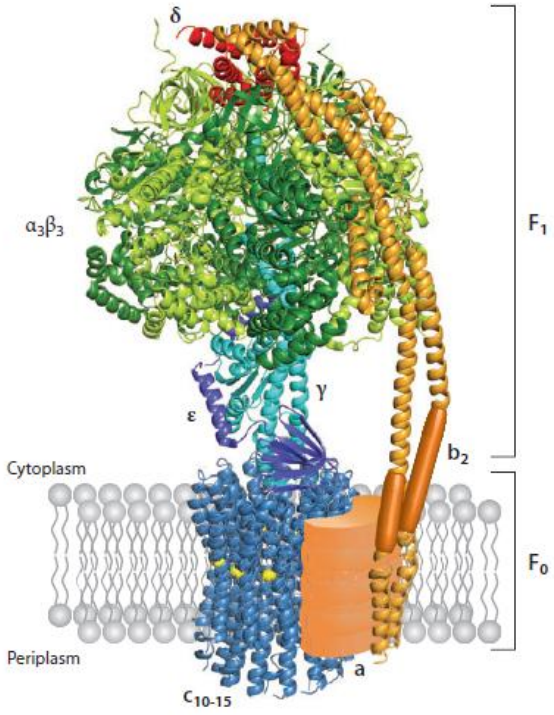


Figure 14.

Organisation structurale de l'ATP synthase. Les structures utilisées pour reconstruire le modèle présenté sont l'anneau c de *Ilyobacter tartaricus* (PDB 1YCE), le domaine F1 de *E. coli* (PDB 1JNV), la sous-unité ð de *E. coli* (PDB 2A7U), la partie soluble de la sous-unité b de la mitochondrie bovine (PDB 2CLY) et la partie membranaire de la sous-unité b de *E. coli* (PDB 1B9U). A ce jour, aucune structure n'est disponible pour la sous-unité a et pour une partie de la sous-unité b (von Ballmoos, Wiedenmann et al. 2009).

4.3. Structure du domaine F_1 de l'ATP synthase

Plusieurs structures du domaine F_1 sont actuellement disponibles (voir annexe 4 pour les codes PDB de toutes les structures résolues). En 1994 l'équipe de John E. Walker (Abrahams, Leslie et al. 1994) a résolu la première structure d'une ATP synthase, le domaine F_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma$ sans δ et ε) de l'ATP synthase mitochondriale bovine à une résolution de 2.8 Å (code PDB 1BMF) (Figure 15). Les premières informations des structures des sous-unités γ et ε ont été obtenues pour l'ATP synthase mitochondriale bovine par la même équipe (code PDB 1E79) (Gibbons, Montgomery et al. 2000) et pour le domaine F_1 de *E. coli* à une résolution de 2.1 Å (code PDB 1JNV) (Rodgers and Wilce 2000). Ces structures permettent d'avoir une idée assez claire de l'organisation du domaine soluble de l'ATP synthase.

4.3.1. Les sous-unités α et β

Trois sous-unités β catalytiques responsables de la synthèse d'ATP et trois sous-unités α structurales forment un cylindre dans lequel elles sont positionnées en alternance. α et β sont constituées de trois domaines : un domaine N-terminal organisé en tonneaux β, un domaine central contenant le site de fixation du

nucléotide et un domaine C-terminal composé de 6 hélices α (7 dans la sous-unité α).

Les sites catalytiques se trouvent dans les sous-unités β à l'interface entre α et β. La structure du complexe $\alpha_3\beta_3$ de la mitochondrie (Figure 15) montre que la structure de chaque domaine β, et donc de chaque site catalytique, n'est pas strictement la même, ce qui permet à chaque sous-unité de lier un nucléotide différent : β_{TP} lie l'ATP, β_{DP} lie l'ADP et β_E est vide. La structure de la sous-unité α est par contre conservée.

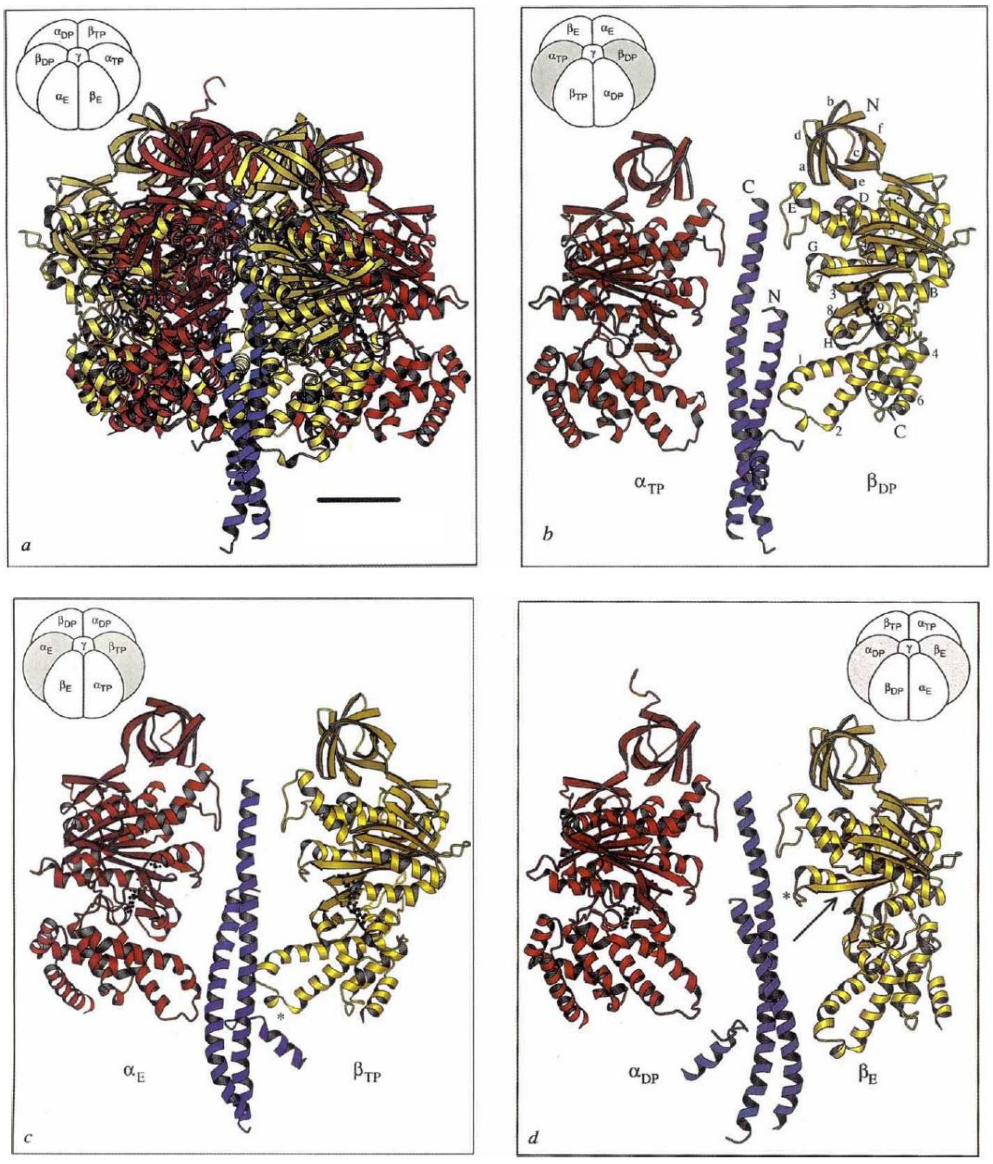


Figure 15. Structure tridimensionnelle du domaine $\alpha_3\beta_3\gamma$ de l'ATP synthase mitochondrial bovine (code PDB 1BMF). Les sous-unités α, β et γ sont respectivement représentées en rouge, jaune et bleu. Les nucléotides sont noirs. Les trois sous-unités α lient l'AMP-PNP (5'-adenylyl-imidophosphate), en analogue de l'ATP. La sous-unité β_{TP} lie l'AMP-PNP. La sous-unité β_{DP} lie l'ADP. La sous-unité β_E ne lie aucun nucléotide. a) La structure complète. b-d) Relation entre les différentes sous-unités α, β et γ. C) L'astérisque indique le motif peptidique DELSEED (Abrahams, Leslie et al. 1994)

Les structures du domaine F_1 de l'ATP synthase bovine en complexe avec différents substrats et inhibiteurs ont également été résolues (codes PDB 1E79, 1H8E, 1OHH, 1W0J, 1W0K, 2JIZ, 2JJ1, 2JJ2) (Gibbons, Montgomery et al. 2000; Menz, Leslie et al. 2001; Cabezon, Montgomery et al. 2003; Kagawa, Montgomery et al. 2004; Gledhill, Montgomery et al. 2007), ainsi que les structures du complexe $\alpha_3\beta_3$ du chloroplaste (code PDB 1FX0) (Groth and Pohl 2001), de *Bacillus* P3S (code PDB 1SKY) (Shirakihara, Leslie et al. 1997) et de la levure (code PDB 2WPD) (Dautant, Velours et al. 2010). L'analyse de l'ensemble de ces structures révèle une organisation structurale identique et une symétrie conservée, et leurs trois sous-unités β possèdent toutes une affinité différente pour les nucléotides. Ces résultats suggèrent donc un mécanisme d'action commun à toutes les ATP synthases des différents domaines de la vie.

4.3.2. La sous-unité γ

La sous-unité γ lie F_1 à F_O. Elle est composée de deux hélices α antiparallèles, qui s'insèrent entre les sous-unités α et β, et des motifs α/β qui lient F_O. L'hélice N-terminale traverse la moitié du complexe $\alpha_3\beta_3$ et l'hélice C-terminale, plus longue, traverse tout le complexe (Figure 15B-D). Sa structure asymétrique lui permet de faire des interactions différentes avec chacune des trois sous-unité β (Muench, Trinick et al. 2011).

4.3.3. La sous-unité δ

La structure de la sous-unité δ a été résolue par RMN pour 134 des 176 résidus de la sous-unité, et cette partie de la protéine est composée de 6 hélices α. La localisation de la sous-unité δ est proche des extrémités N-terminales du complexe $\alpha_3\beta_3$ et elle appartient au domaine périphérique de l'ATP synthase qui lie F_1 à F_O (Figure 12A et 14) (Wilkens, Dunn et al. 1997).

4.3.4. La sous-unité ε

La sous-unité ε est située en proximité de la sous-unité γ et du domaine F_O (Figure 12A et 14). Elle est composée de deux domaines, une extrémité N-terminale structurée en 10-feuillets β et une extrémité C-terminale formée de deux hélices α antiparallèles. Il a été montré que cette sous-unité pouvait avoir un rôle dans la régulation de l'ATP synthase chez les bactéries et chez les plantes par

contrôle de l'activité d'hydrolyse de l'ATP par la protéine. Cette régulation est utile pour éviter d'aboutir, dans certaines conditions, à une déplétion d'ATP. Pour cette raison, les bactéries, tout comme les chloroplastes et les mitochondries, ont développé des mécanismes de régulation (von Ballmoos, Cook et al. 2008).

L'extrémité C-terminale de la sous-unité ε peut se trouver dans deux conformations : une conformation compacte bien repliée sur l'extrémité N-terminale loin de $\alpha_3\beta_3$, et une conformation ouverte allongée autour de la sous-unité γ faisant des contacts avec deux sous-unités α et β (Figure 16). En présence d'ATP, ε est en conformation compacte, mais, quand l'ATP commence à manquer, ε passe en conformation ouverte et va ainsi inhiber l'activité d'hydrolyse de l'ATP synthase (Yagi, Kajiwara et al. 2007; Cingolani and Duncan 2011).

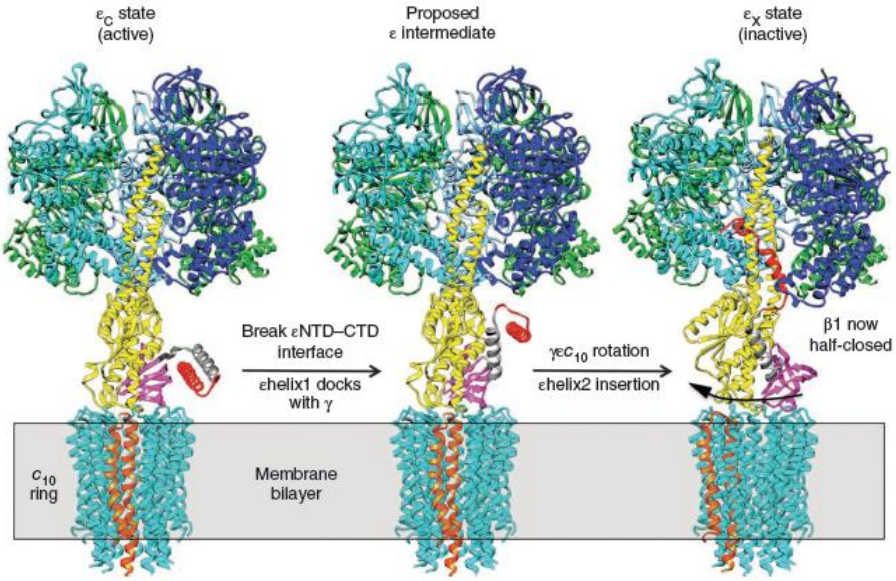


Figure 16. Modèle de la transition entre les deux conformations de la sous-unité ε. ε_O est la conformation compacte sur γ et ε_X est l'ouverte vers $\alpha_3\beta_3$.

4.4. Structure du domaine F_O de l'ATP synthase

Le domaine Fo contient les canaux permettant le transfert des ions à travers la membrane. Ce domaine est composé des sous-unités $ab_2c_{8\text{-}15}$ (Figure 12A et 14). Il s'agit d'un complexe protéique membranaire extrêmement hydrophobe. Les protéines membranaires étant encore aujourd'hui des protéines difficiles à manipuler, il existe à ce jour peu de structures des différentes sous-unités de F_O (voir annexe 4 pour les codes PDB des structures résolues) et nous

avons donc peu d'information sur leur conformation tridimensionnelle et sur leurs contacts au sein du domaine. Nous avons donc peu d'information sur le mécanisme d'action général de F_O.

4.4.1. La sous-unité a

Il n'existe pour le moment aucune structure de la sous-unité a. Grâce à des expériences de mutagénèse dirigée, d'analyses de cross-linking et à des modèles basés sur l'homologie de séquence, il a été montré que cette protéine est composée de cinq hélices transmembranaires, avec une extrémité N-terminale située dans le périplasme et une extrémité C-terminale dans le cytoplasme (Muench, Trinick et al. 2011). Les deux boucles hydrophiles positionnées dans le cytoplasme sont importantes pour l'activité de l'enzyme, et les deux boucles périplasmiques sont indispensables pour l'assemblage de la sous-unité a. Les hélices α4 et α5 sont probablement en contact avec deux sous-unités c adjacentes. L'acide aminé Arg210 (numérotation *E. coli*) de l'hélice α4 a été identifié comme résidu clé de la sous-unité a, indispensable pour l'interaction avec la sous-unité c et le transfert des protons au travers de F_O (Vik and Ishmukhametov 2005).

4.4.2. La sous-unité b

La sous-unité b est organisée en homodimère (il existe deux gènes différents chez le chloroplaste) et lie le domaine F_O au domaine F_1. Comme pour la sous-unité a, aucune structure complète n'a été déterminer à ce jour, même si nous avons à notre disposition des structures partielles : le domaine membranaire et une partie du domaine soluble (codes PDB 2CLY, 1B9U, 1L2P). Avec une structure hélicoïdale, son domaine N-terminal membranaire est situé à coté de la sous-unité a, tandis que le domaine C-terminal lie le domaine F_1 et en particulier les sous-unités α et δ (Figure 12A). Son rôle n'est pas encore complètement clair mais l'hypothèse la plus probable est que grâce à sa flexibilité elle fasse principalement un lien élastique entre F_1 et F_O pendant la synthèse d'ATP (Dunn, Revington et al. 2000).

4.4.3. La sous-unité c

La sous-unité c s'organise en une structure multimérique et forme un anneau ancré dans la membrane. Le nombre de monomères c constituant l'anneau est variable selon l'espèce. Grâce à l'étude structurale de la sous-unité c de différents organismes par des méthodes tel que la cryo-microscopie électronique, la cristallisation et la diffraction aux rayons X, la microscopie à force atomique, le cross-linking et la spectrométrie de masse LILBID (laser-induced liquid bead ion desorption-MS), nous connaissons le nombre de monomères constituant l'anneau c de l'ATP synthase de différentes espèces (Tableau 6).

Organisme	Nombre de sous-unité c	Référence
Mitochondrie	8	(Watt, Montgomery et al. 2010)
Saccaromices cerevisiae	10	(Stock, Leslie et al. 1999)
Bacillus PS3	10	(Mitome, Suzuki et al. 2004)
Escherichia coli	10	(Jiang, Hermolin et al. 2001)
Ilyobacter tartaricus	11	(Vonck, von Nidda et al. 2002)
Propionigenium modestum	11	(Meier, Matthey et al. 2003)
Clostridium paradoxum	11	(Meier, Ferguson et al. 2006)
Thermus thermophilus	12	(von Ballmoos, Wiedenmann et al. 2009)
Bacillus sp. strain TA2.A1	13	(Meier, Morgner et al. 2007)
Bacillus pseudofirmus OF4	13	(Preiss, Yildiz et al. 2010)
Chloroplaste	14	(Vollmar, Schlieper et al. 2009)
Spirulina platensis	15	(Pogoryelov, Yu et al. 2005)

Tableau 6. Nombre de monomères constituant l'anneau c de l'ATP synthase de différentes espèces.

La première structure d'un monomère de sous-unité c issu de *E. coli* a été résolue par RMN en 1998 par Mark E. Girvin et ses collaborateurs (codes PDB 1C0V, 1C99) (Girvin, Rastogi et al. 1998). Ce monomère (Figure 17A) est constitué de deux hélices α transmembranaires liées par une boucle hydrophile. Des études biochimiques ont permis de montrer que l'acide aminé le plus important de la sous-unité c, essentiel pour le transfert des ions à travers F_O, est l'Asp61 (numérotation *E. coli*).

En 1999, la structure cristallographique du complexe F_1-c_{10} de la levure a été résolue (code PDB 1QO1) (Stock, Leslie et al. 1999). Cette même structure a ensuite été réaffinée à une résolution de 3.43 Å en 2010 (code PDB 2WPD) (Dautant, Velours et al. 2010). Les différentes sous-unités c sont associées et forment une structure cylindrique. La première hélice de chaque monomère participe à la formation d'un premier anneau interne, la deuxième hélice participe à la formation d'un deuxième anneau externe. La boucle hydrophile, très conservée, est localisée dans le cytoplasme et fait des interactions avec les sous-unités γ et ε (Figure 17B).

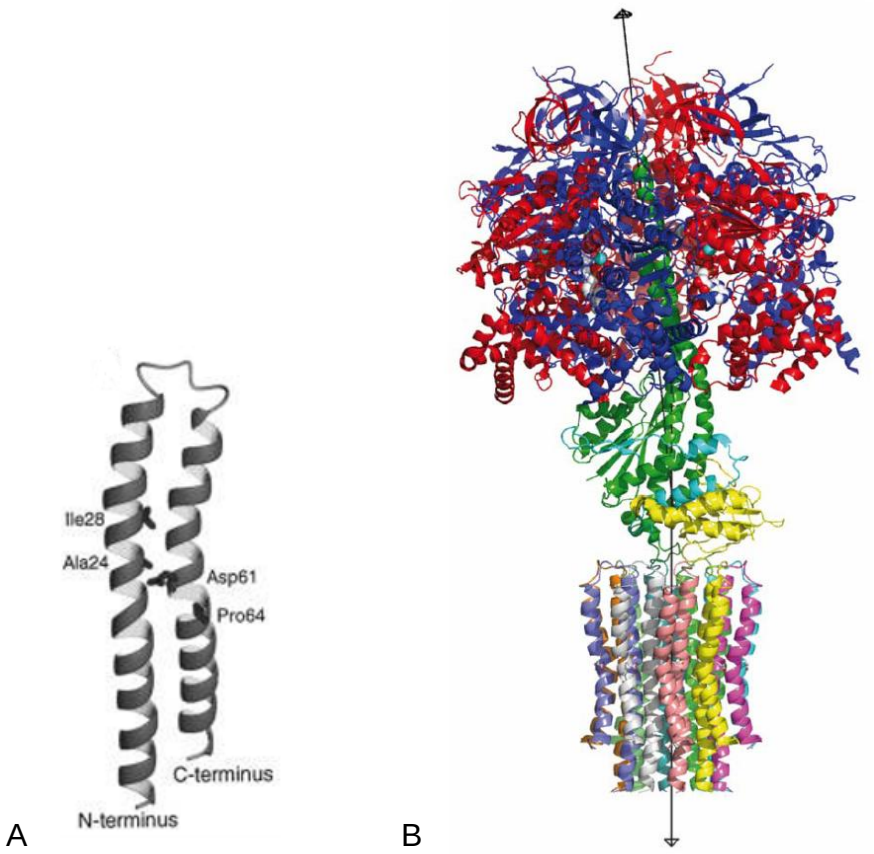


Figure 17. (A) Monomère de la sous-unité c de *E. coli* (code PDB 1C0V), (B) complexe F_1-c_{10} de la levure (code PDB 1Q01).

Quatre structures cristallographiques de l'anneau c ont été résolues très récemment. La première structure à haute résolution d'un anneau c (2.4 Å) a été obtenue pour la bactérie anaérobie alcalophile *Ilyobacter tartaricus* (codes PDB 1YCE-2WGM) (Meier, Polzer et al. 2005; Meier, Krah et al. 2009). Cette structure est un anneau incurvé d'une hauteur d'environ 70 Å, d'une largeur de 40 Å au centre et de 50 Å aux extrémités (Figure 18). L'extrémité N-terminale des hélices

est localisée à l'intérieur de l'anneau et l'extrémité C-terminale plus courte à la périphérie.

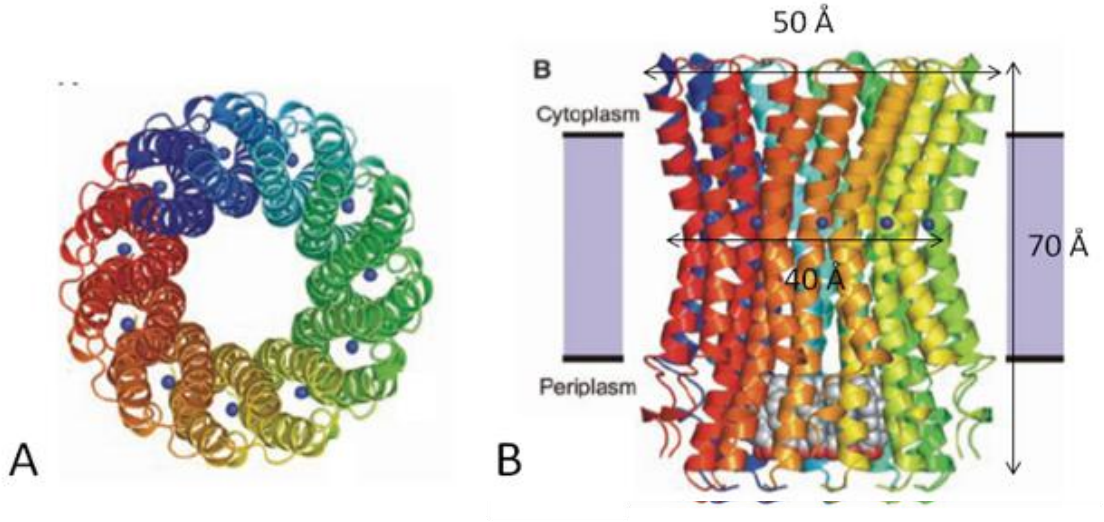


Figure 18. Structure de l'anneau de sous-unités c à 11 monomères de *I. tartaricus* (code PDB 1YCE). Chaque sous-unité c a une couleur différente. (A) Vue d'en haut du coté cytoplasmique. (B) Vue de coté. Les sphères bleues sont les ions Na^+. Les sphères rouges et grises sont des molécules de détergent à l'intérieur de l'anneau.

Plus récemment, trois autres structures à haute/moyenne résolution ont été résolues.

La structure de l'anneau c de la cyanobactérie *Spirulina platensis* (Pogoryelov, Yildiz et al. 2009) a été résolue à une résolution de 2.1 Å (code PDB 2WIE) (Figure 19). Cet anneau est composé de 15 monomères et il contient de la chlorophylle a et des caroténoïdes. La structure est stable et bien ancrée dans la membrane thylacoïdale grâce à des charges électrostatiques présentes sur les deux cotés de l'anneau ainsi que des résidus hydrophobes présents à l'intérieur, permettant de stabiliser cet anneau dans la membrane.

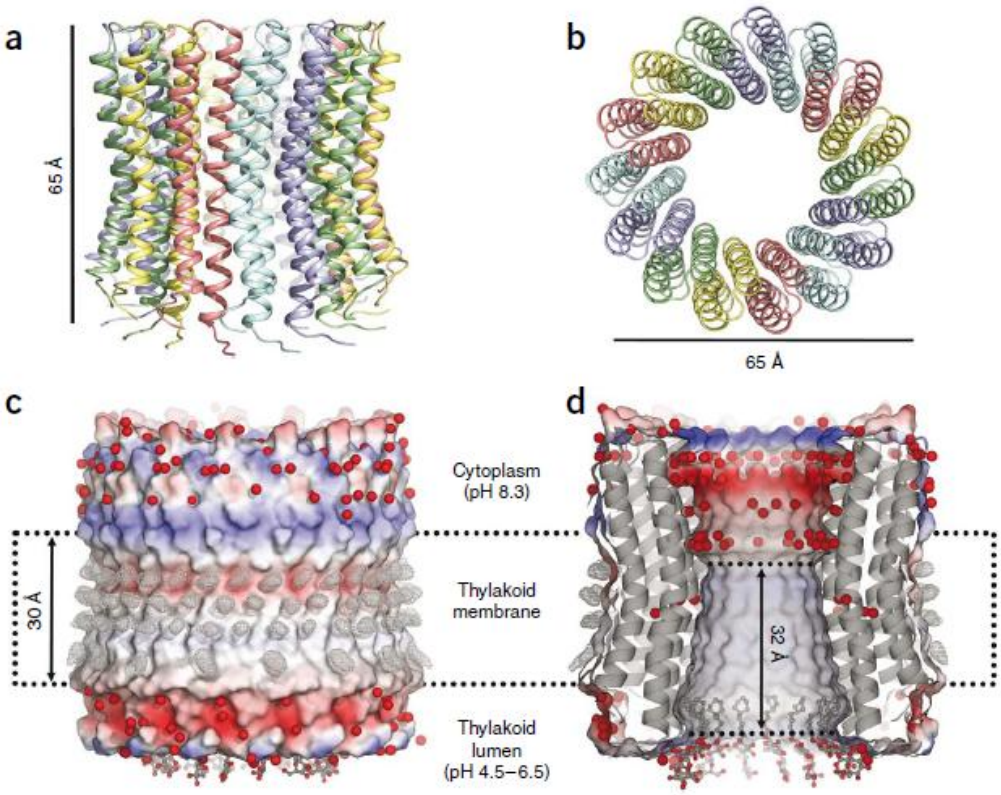


Figure 19. Structure de l'anneau c à 15 monomères de *S. platensis*. (code PDB 2WIE) (A) Vue de coté, (B) vue d'en haut ; (C-D) surface électrostatique : en rouge les acides aminés négatifs, en bleu les positifs, en gris les neutres. Les molécules de détergent sont représentées en ball-and-stick.

La structure de l'anneau de sous-unité c de chloroplaste à 3.9 Å de résolution (code PDB 2W5J) a été résolue par Vollmar et collègues en 2009 (Vollmar, Schlieper et al. 2009). Cette structure montre un anneau d'un diamètre externe de 58 Å et d'un diamètre interne de 25 Å au milieu et 38 Å aux extrémités (Figure 20).

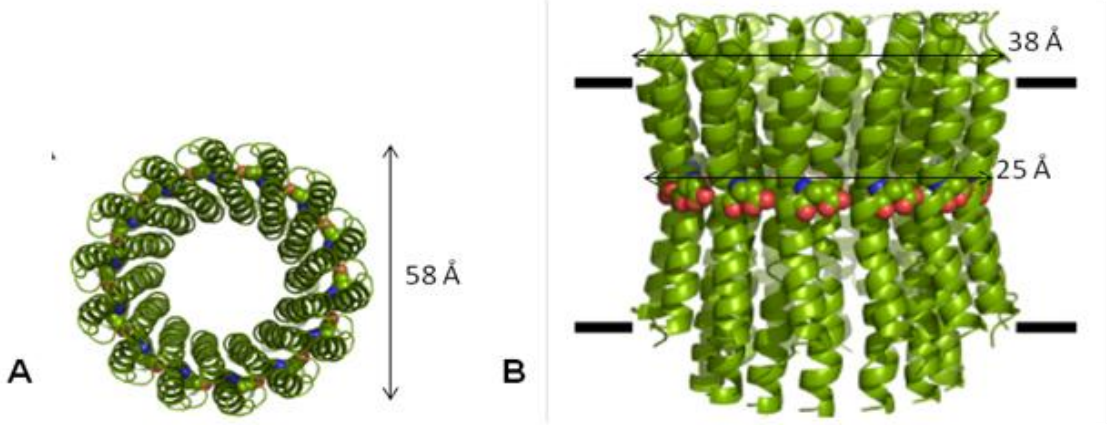


Figure 20. Structure de l'anneau c à 14 monomères du chloroplaste (code PDB 2W5J). (A) vue d'en haut, (B) vue de coté. Le résidu Glu61 est représenté avec des sphères.

Enfin, la structure résolue dernièrement est celle de *Bacillus pseudofirmus* OF4 à 2.5 Å (code PDB 2X2V) (Preiss, Yildiz et al. 2010). Cet alcalophile extrême possède un anneau à 13 monomères, avec des extrémités N- et C- terminales particulièrement courtes par rapport aux autres espèces (Figure 21).

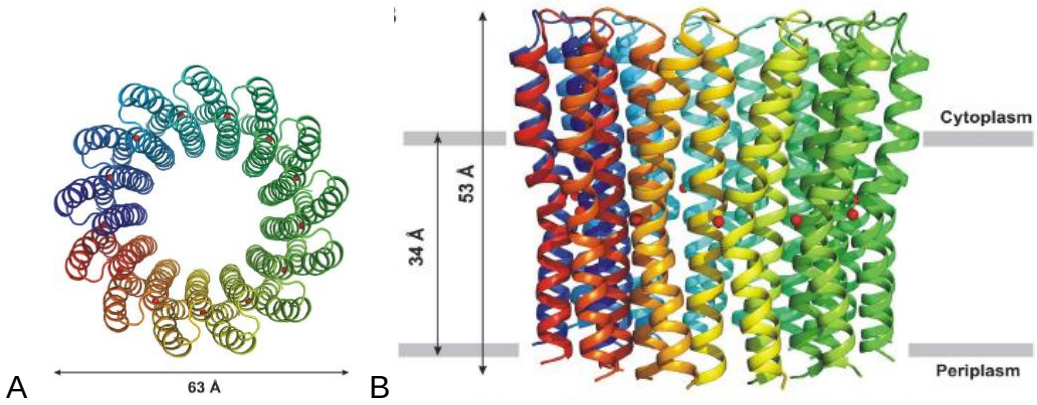


Figure 21. Structure de l'anneau à 13 monomères de *B. pseudofirmus* OF4 (code PDB 2X2V). Chaque monomère a une couleur différente. (A) vue d'en haut par le cytoplasme, (B) vue de coté. La sphère rouge représente le proton.

Grâce aux informations structurales apportées par ces structures obtenues à plus ou moins haute résolution, le site de fixation du proton a pu être caractérisé. Il se trouve à l'interface de deux monomères et trois hélices. La nature des acides aminés qui coordonnent l'ion est différente d'un anneau à un autre, mais leur positionnement est conservé et donc le site d'interaction de l'ion est conservé d'une espèce à une autre (Figure 22). Le carboxylate essentiel pour le transfert des ions est une fonction présente dans tous les anneaux. Ce carboxylate est un Glu ou un Asp selon l'organisme, et sa chaîne latérale est engagée dans des liaisons hydrogènes avec des acides aminés de l'hélice C-terminale du même monomère et des acides aminés du monomère adjacent (Leone, Krah et al. 2010). Lorsqu'un ion est fixé, le carboxylate est orienté entre les deux hélices dans une conformation stable qui le protège de l'environnement hydrophobe.

Parmi les ATP synthases dont la structure de l'anneau c a été déterminée, on trouve des ATP synthases à H^+ et à Na^+. *I. tartaricus* a une ATP synthase à ion Na^+ (Figure 22A). Ces ATP synthases ont uniquement été identifiées chez certaines bactéries anaérobies alcalophiles, probablement à cause de

l'environnement particulier dans lequel elles vivent, mais leur structure et leur fonctionnement sont les mêmes que pour les ATP synthases à protons (Mulkidjanian, Dibrov et al. 2008). Même si l'ion est différent, le site de fixation et la coordination de l'ion sont très proches de ceux d'une ATP synthase à protons comme par exemple celles de *S. platensis*, du chloroplaste et de *B. pseudofirmus* OF4.

Ainsi, chez *I. tartaricus*, le Na^+ est stabilisé grâce à cinq coordinations et une molécule d'eau. L'ion est coordonné par les résidus Glu65, Gln32, Val63, Ser66 et une molécule d'eau. Des liaisons supplémentaires entre le Glu65 et la Gln32, la Ser66 et la Tyr70, ainsi qu'entre la molécule d'eau d'une part et l'Ala64 (carbonyle de la chaîne principale) et la Thr67 d'autre part, stabilisent la coordination (Figure 22A) (Meier, Krah et al. 2009).

La structure de *S. platensis* (Figure 22B) est la structure à plus haute résolution obtenue pour une ATP synthase à H^+. Le Glu62 protoné a un oxygène engagé dans une liaison hydrogène avec le Gln29 du même monomère, l'autre oxygène du Glu62 étant engagé dans une liaison avec la Tyr67 de l'autre monomère et avec le carbonyle de la chaine principale du résidu Phe60 (Figure 22B).

La structure de l'anneau du chloroplaste a été déterminée à une résolution assez basse par rapport aux autres structures, et le site de fixation du proton n'a pas pu être établi dans le détail. Il a été reconstruit par remplacement moléculaire grâce à la structure de *S. platensis* (Krah, Pogoryelov et al. 2010) : le Glu61 protoné forme des liaisons avec les résidus Gln28, Phe59 et Tyr66 (Figure 22C).

Chez *B. pseudofirmus* OF4, le site de coordination est composé des résidus Glu54, Leu52, Ala53 et Val56 (Figure 22D). La possibilité de l'implication d'un ion H_3O^+ a été formulée pour cette ATP synthase, mais d'autres études (Leone, Krah et al. 2010) suggèrent le contraire.

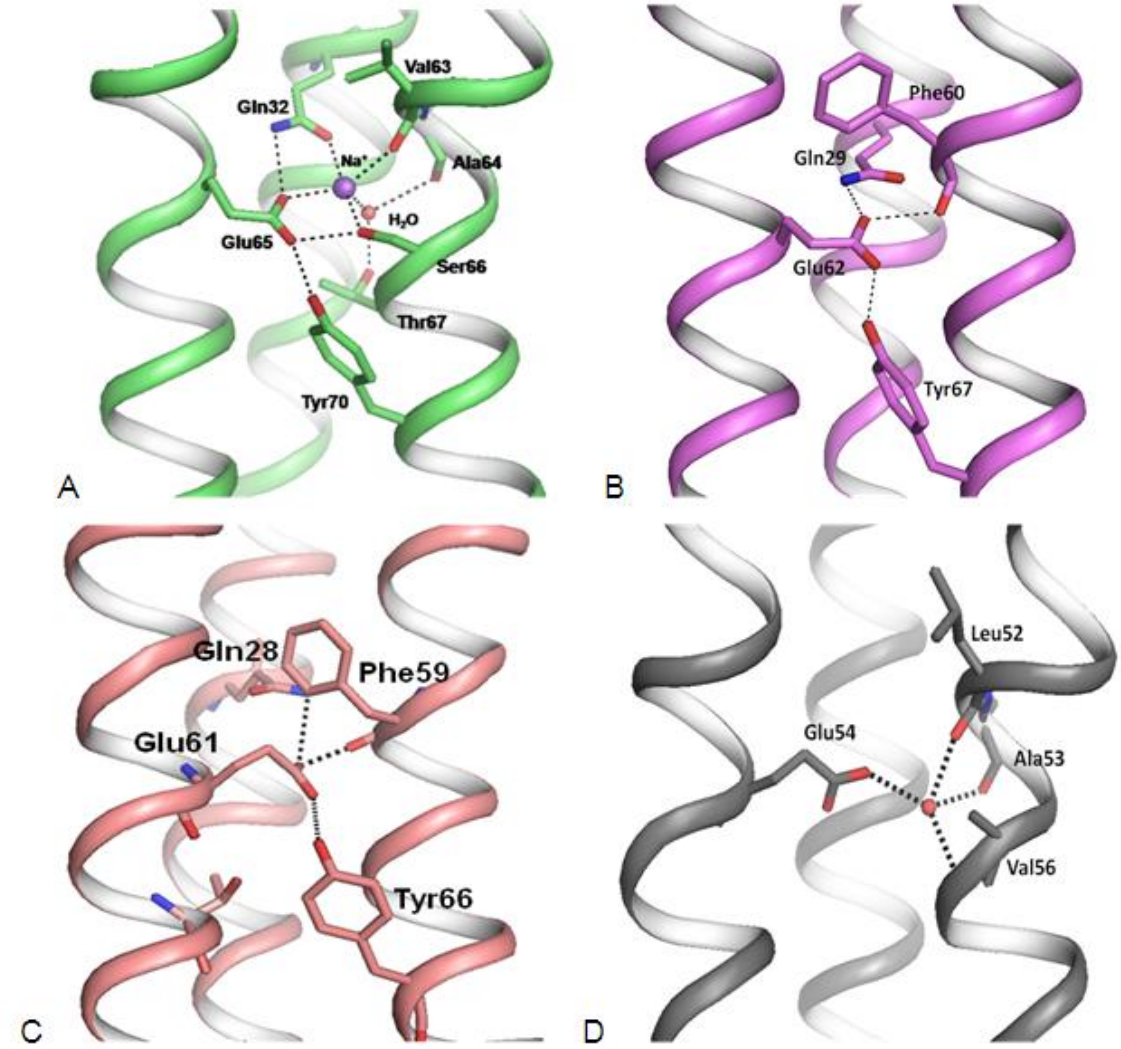


Figure 22. Site de fixation de l'ion H+ ou Na+ dans l'ATP synthase. (A) *I. tartaricus* (code PDB 2WGM), (B) *S. platensis* (code PDB 2WIE), (C) chloroplaste (code PDB 2W5J), (D) *B. pseudofirmus* OF4 (code PDB 2X2V).

4.5. Mécanisme d'action de l'ATP synthase

Les domaines F_1 et F_O fonctionnent comme deux rotors coopératifs qui tournent, l'un pour synthétiser l'ATP et l'autre pour transporter les protons (ou les ions Na^+).

4.5.1. La synthèse de l'ATP via le domaine F_1

A la base du mécanisme d'action de F_1 il y a ce que Paul D. Boyer pendant les années 60s-70s appelait « mécanisme de changement de liaisons » (binding change mechanism) (Kayalar, Rosing et al. 1977). Ce mécanisme peut être schématisé comme montré dans la Figure 23, qui représente un cycle d'hydrolyse

d'ATP. Comme nous avons pu le voir via la détermination de la structure du domaine F_1 de la mitochondrie bovine (Figure 15), chaque sous-unité β a une conformation différente et possède une affinité différente pour les nucléotides. Lorsque la sous-unité γ tourne en faisant trois rotations de 120°, les trois sous-unités β changent de conformation et leur affinité pour les nucléotides est donc modifiée. La sous-unité γ tourne dans le sens des aiguilles d'une montre pour synthétiser l'ATP, et dans le sens opposé pour hydrolyser l'ATP (vue à partir de F_O).

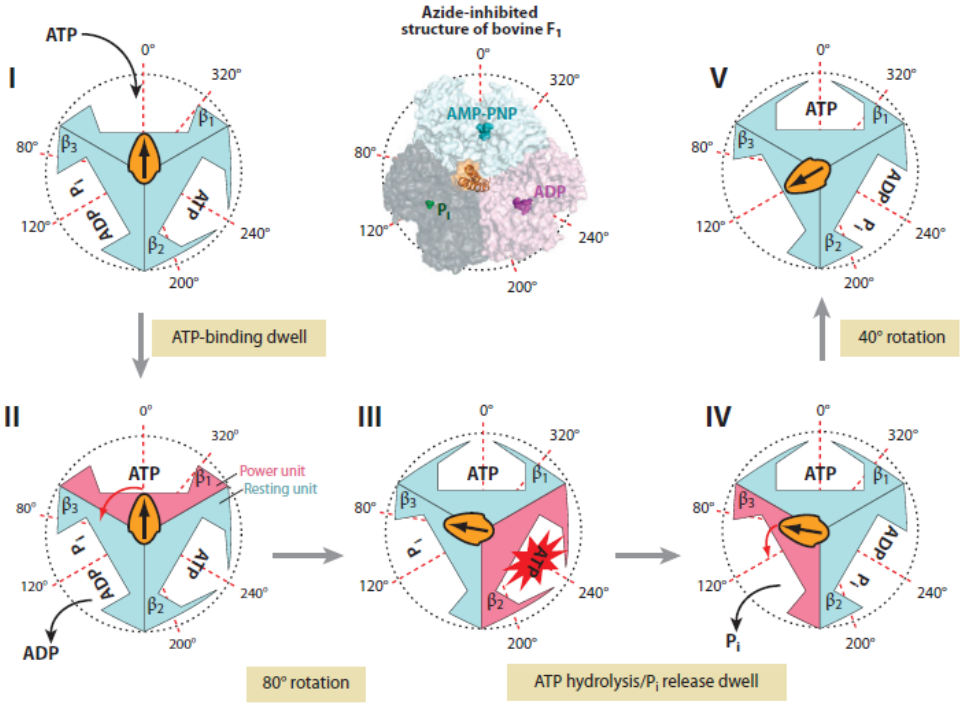


Figure 23. Schéma d'un cycle de hydrolyse de l'ATP (von Ballmoos, Wiedenmann et al. 2009).

Le cycle d'hydrolyse de l'ATP se fait en 3 étapes (Figure 23). Dans un premier temps, une molécule d'ATP se lie sur la première sous-unité β qui est « vide » (β_E) et la sous-unité γ tourne de 80°-90°. Dans un deuxième temps, la molécule d'ATP présente sur la deuxième sous-unité β (β_{TP}) est hydrolysée et on a libération d'ADP. La dernière étape est la sortie du P_i qui provoque une rotation de la sous-unité γ de 40°-30° (rotation totale de 120°). Cette troisième étape catalytique pourrait aussi impliquer l'intervention d'ions Mg^{2+} (Nakamoto, Baylis Scanlon et al. 2008; von Ballmoos, Wiedenmann et al. 2009). Les autres sous-

unités β suivent le même cycle d'hydrolyse, mais décalé de 120° de façon à hydrolyser trois ATP tous les 360° (Ariga, Muneyuki et al. 2007). Pour synthétiser l'ATP, l'ATP synthase opère de la même façon mais dans le sens opposé.

L'occupation de deux ou trois sites catalytiques durant la réaction catalytique est encore une question ouverte (Junge, Sielaff et al. 2009). L'étape limitante qui nécessite de l'énergie est la troisième étape de rotation de 40° (Scanlon, Al-Shawi et al. 2008). Il a été montré que le motif ^{380}DELSEED^{386} de la sous-unité β (sur la Figure 15D) interagit avec la sous-unité γ et contribue ainsi à l'asymétrie du site catalytique (Scanlon, Al-Shawi et al. 2008).

La rotation des sous-unités γ et ε selon l'axe de F_1 permet les transitions dans les différentes conformations de β et la production d'ATP. En particulier, la sous-unité γ s'enroule, se déroule et tourne de façon à changer les contacts avec $\alpha_3\beta_3$ (Hausrath, Capaldi et al. 2001). Des expériences ont permis de démontrer la rotation de la sous-unité γ par rapport au complexe $\alpha_3\beta_3$. Noji et collègues (Noji, Yasuda et al. 1997) ont été les premiers à l'observer en donnant une explication visible au mécanisme de changement de liaisons de Paul D. Boyer. Des expériences complémentaires faites par Yasuda et collègues, (Yasuda, Noji et al. 2001) et par Furuike et collègues (Furuike, Nakano et al. 2011) ont permis de mieux visualiser les étapes de la rotation : trois étapes de 120°, chacune formée de sous-rotations de 80°-90° et 40°-30°.

4.5.2. Le transfert des ions via le domaine F_O

La fonction du domaine F_O est de permettre le transfert des protons (ou des ions Na^+) à travers la membrane. Ce transfert ce fait grâce à la rotation de l'anneau de sous-unité c par rapport aux sous-unités a et b_2. Les acides aminés indispensables pour permettre le transfert des ions sont, dans la sous-unité c, un résidu portant un groupement carboxylate (Aspartate ou Glutamate selon les ATP synthases) et dans la sous-unité a une Arginine. Même si le transfert se fait par l'intermédiaire des sous-unités a et c, il a été montré *in vitro* que les trois sous-unités (a, b et c) sont indispensables, la sous-unité b ne servant pas uniquement de liaison entre F_1et F_O (von Ballmoos, Cook et al. 2008).

Le débat sur le mécanisme de transfert des ions est toujours un sujet important. La théorie actuellement admise, établie d'après la résolution des quatre

structures connues, est résumée sur la Figure 24. Dans les quatre structures qui ont été déterminées, le carboxylate très conservé est protoné. Pendant son transfert, l'ion est donc coordonné par le groupe carboxylate du résidu conservé (Asp ou Glu) de la sous-unité c. Ce résidu conservé présente deux conformations. La première conformation est appelée « proton-locked state ». Dans cet état, la chaîne latérale du résidu Asp/Glu est orientée vers l'intérieur de l'anneau et il existe des liaisons intramoléculaires établies avec d'autres résidus de la cavité, qui permettent sa stabilisation et le protègent de l'environnement hydrophobe. Dans la deuxième conformation, qui est appelée « open state », le carboxylate déprotoné est complètement exposé à la périphérie de l'anneau à l'interface des sous-unités a/c (Vollmar, Schlieper et al. 2009).

Pendant la rotation de l'anneau c et le transfert des protons, le carboxylate protoné, en conformation fermée (niveau 0 sur la Figure 24), arrive à l'interface a/c. L'exposition à un environnement plus hydrophile pourrait faciliter le relâchement du H^+/Na^+ et le passage à la conformation ouverte (niveau 1 sur la Figure 24). Dans cette conformation, l'Asp/Glu est exposé à l'Arg de la sous-unité a avec laquelle il peut faire un pont salin, ce qui stabilise l' « open state » (niveau 2 sur la Figure 24). L'arrivée d'un nouvel ion va dissocier la liaison entre les deux résidus et protoner l'Asp/Glu, qui peut retourner dans la conformation fermée (niveau 0 sur la Figure 24). Lorsque le résidu Asp/Glu est reprotoné et stabilisé dans sa forme fermée, la sous-unité c peut retourner dans l'environnement lipidique de la membrane, ce qui permet la rotation de l'anneau c (Pogoryelov, Yildiz et al. 2009; Pogoryelov, Krah et al. 2010).

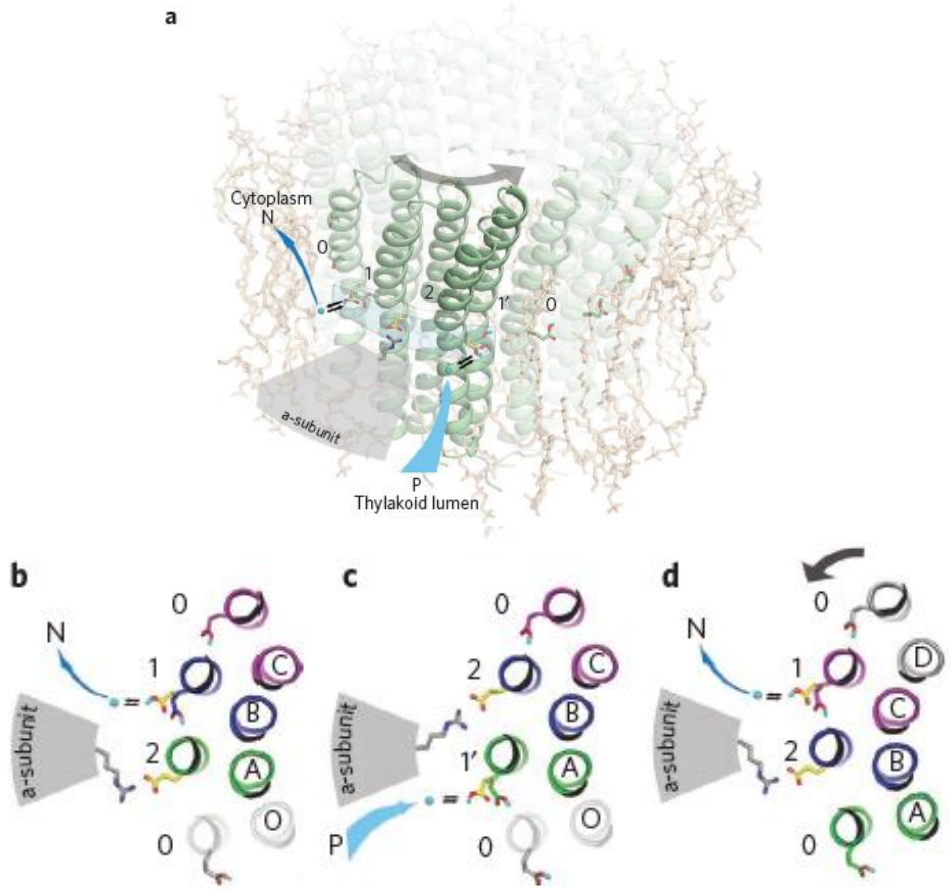


Figure 24. Mécanisme proposé pour le transfert des ions à travers le domaine F_O (Pogoryelov, Krah et al. 2010).

Deux demi-canaux sont présents dans le domaine F_O pour l'entrée et la sortie des ions. Mais la localisation de ces canaux fait encore l'objet d'un débat dans la communauté scientifique. Meier et collègues ont proposé leur localisation dans l'anneau de sous-unité c (Meier, Matthey et al. 2003) mais aucun canal n'a pu être identifié dans les structures cristallographiques (Meier, Polzer et al. 2005; Vollmar, Schlieper et al. 2009). Le modèle actuel propose la présence d'un demi-canal dans la sous-unité a pour l'entrée des ions par le périplasme et la protonation du carboxylate conservé de la sous-unité c (Angevine, Herold et al. 2007), et d'un autre demi-canal de sortie vers le cytoplasme sur l'interface sous-unités a/c qui permet la déprotonation de l'Asp/Glu (Steed and Fillingame 2008; Steed and Fillingame 2009).

La visualisation directe de la rotation de l'anneau c, à la base du transfert des ions à travers F_O, a été montrée par Sambongi et al. (Sambongi, Iko et al.

1999). Des expériences plus récentes de mesures par FRET (Ishmukhametov, Hornung et al. 2010) ont permis de mesurer pour l'anneau c de *E. coli* (10 monomères) des rotations de 36°, avec des pauses entre chaque pas, probablement dues aux interactions sous-unités a/c.

4.5.3. La synthèse de l'ATP via le domaine F_1 se fait grâce au transfert des ions via le domaine F_O

Le mécanisme général de l'ATP synthase est schématisé sur la Figure 25 : le passage des ions à travers les sous-unités a et c conduit à la rotation de l'anneau c et par conséquence à la rotation des sous-unités γ et ε. La sous-unité γ lors de sa rotation provoque des changements de conformation dans le complexe $\alpha_3\beta_3$ et permet ainsi la synthèse/hydrolyse d'ATP.

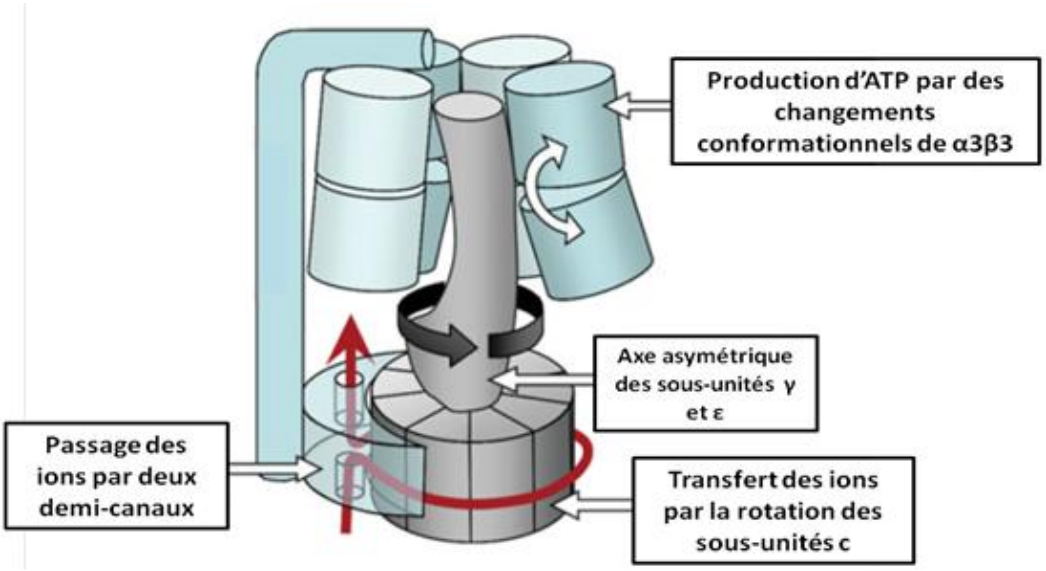


Figure 25. Modèle général du mécanisme de rotation de l'ATP synthase. En gris les sous-unités qui tournent et en bleu les sous-unités statiques (Muench, Trinick et al. 2011).

Des vidéos de la rotation de l'ATP synthase sont disponibles aux pages web suivantes :

http://www.dnatube.com/video/104/ATP-synthase-structure-and-mechanism

http://www.youtube.com/watch?v=3y1dO4nNaKY

http://www.youtube.com/watch?v=W3KxU63gcF4

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le nombre de monomères présents dans l'anneau est variable d'une espèce à une autre. Le nombre d'ions

transférés par cycle via F_O est fonction du nombre de monomères dans la sous-unité c. Si F_1 peut synthétiser 3 molécules d'ATP par cycle (360°), la variation du nombre de sous-unité c fait varier le rapport H^+/ATP. Différentes stœchiométries et donc différents rapports H^+/ATP pourraient être une adaptation aux conditions environnementales et donc aux différents P/SMF. Les grands anneaux ont un rapport H^+/ATP ratio élevé qui peut être avantageux pour synthétiser l'ATP avec une P/SMF basse. Par contre, des anneaux petits ont un rapport H^+/ATP bas qui pourrait être favorable à haute P/SMF (Dimroth, von Ballmoos et al. 2006; Muench, Trinick et al. 2011). Le plus petit anneau connu, 8 monomères, est celui de la mitochondrie (Watt, Montgomery et al. 2010), le plus grand, 15 monomères, celui de *S. platensis* (Pogoryelov, Yildiz et al. 2009).

L'explication de la coordination entre la rotation de l'anneau c et la rotation de la sous-unité γ reste à clarifier. Le nombre de pas de l'anneau c est variable selon le nombre de sous-unités c mais, par contre, la rotation de la sous-unité γ est toujours composée de 3 pas de 120° divisés en deux étapes de 80°-90° et 40°-30°. Comment associer les rotations d'un anneau de 8 à 15 monomères avec 3 pas de 120°? La réponse à cette question pourrait être trouvée dans la sous-unité γ. Il a été montré que cette sous-unité peut être un élément hautement élastique, surtout dans la partie en contact avec les sous-unités a et c. Elle serait donc capable d'accumuler l'énergie de rotation de l'anneau c et l'utiliser pour tourner seulement quand cette énergie est suffisante pour faire une rotation de 120° (Wachter, Bi et al. ; Capaldi and Aggeler 2002; Sielaff, Rennekamp et al. 2008).

4.6. L'ATP synthase des mycobactéries

4.6.1. La chaîne respiratoire mycobactérienne

Les lipoquinones impliquées dans la chaine respiratoire des bactéries sont des ménaquinones et des ubiquinones (les mammifères ont seulement les ubiquinones). Chez les mycobactéries, les ménaquinones (2-methyl-3-polyprenyl-1,4-naphthoquinones) sont les lipoquinones prédominantes (Dhiman, Mahapatra et al. 2009).

La chaîne respiratoire des mycobactéries est schématisée sur la Figure 26 (Bald and Koul 2010). La ménaquinone est tout d'abord réduite par la NADH déhydrogénase de type 2 (NDH-2) ou par la succinate déhydrogénase (SdhA-C). Deux enzymes sont responsables de sa reoxydation dans des conditions normales aérobies : le complexe cytochrome bc1 (QcrA-C) et la cytochrome oxydase aa_3-type (CtaC-F). Ces complexes protéiques forment un super complexe dans la membrane et couplent la réaction au transfert de protons. Par contre, en situation de carence d'oxygène, la ménaquinone est oxydée par la cytochrome bd oxydase (CytA-B) qui ne transfert pas de protons mais qui a une affinité plus forte pour l'oxygène.

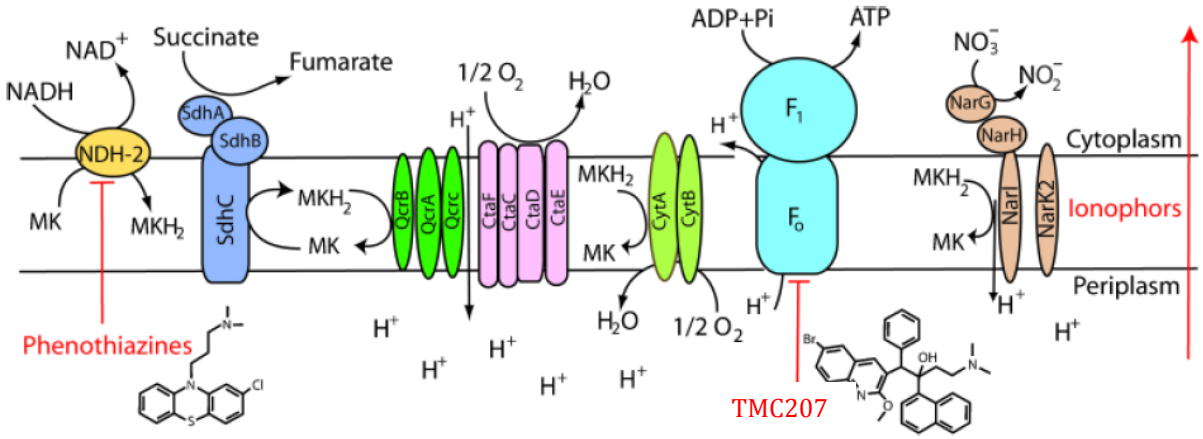


Figure 26. Schéma de la chaîne respiratoire des mycobactéries. En rouge des molécules qui bloquent des composants de la chaîne respiratoire et qui sont bactéricides sur les mycobactéries en phase active de réplication comme sur les mycobactéries en phase de dormance.

Pour s'adapter à la phase de dormance, les mycobactéries sous-expriment ou sur-expriment certains gènes, en particulier ceux de la chaîne respiratoire. NDH-2 et CytA sont surexprimés. Par contre, QcrB, CtaB et ATP synthase sont sous-exprimés. Enfin, la nitrate réductase (NarG-I), qui est également surexprimée, a été proposée comme étant l'accepteur final des électrons (Rao, Alonso et al. 2008; Bald and Koul 2010).

4.6.2. Caractéristiques de l'ATP synthase mycobactérienne

Les mycobactéries possèdent une ATP synthase à protons. Même si certaines bactéries pathogènes, comme *Vibrio cholerae* et *Klebsiella pneumoniae,* substituent la FPM avec la FSM une fois dans leur hôte, l'absence de pompe à

Na^+ chez *M. tuberculosis* confirme que la bactérie utilise uniquement la FPM (Hase, Fedorova et al. 2001). L'ATP synthase est une enzyme essentielle pour la croissance des mycobactéries (Tran and Cook 2005).

L'ATP synthase a en règle générale la capacité d'inverser son activité pour hydrolyser l'ATP lorsqu'il y a une diminution de la FPM. Par contre, chez certaines bactéries, comme par exemple les bactéries alcalophiles (Stocker, Keis et al. 2007), *Thermus thermophilus et Mycobacterium phlei* (Higashi, Kalra et al. 1975), l'activité d'hydrolyse est latente et très basse. Chez *M. bovis* et chez *M. smegmatis*, l'ATP synthase ne peut pas hydrolyser l'ATP, elle est par conséquence incapable de générer un gradient protonique. La sous-unité ε est responsable de cette inhibition qui est plus forte chez les mycobactéries à croissance lente par rapport aux mycobactéries à croissance rapide, probablement à cause de l'intérêt que représente une adaptation à un environnement avec une FPM faible et une concentration en oxygène basse, typiques des cavités pulmonaires (Haagsma, Driessen et al. 2010).

Au niveau génétique, les gènes codant pour l'ATP synthase mycobactérienne sont au nombre de huit et ils sont organisés en opéron, l'opéron *atp* (Figure 27).

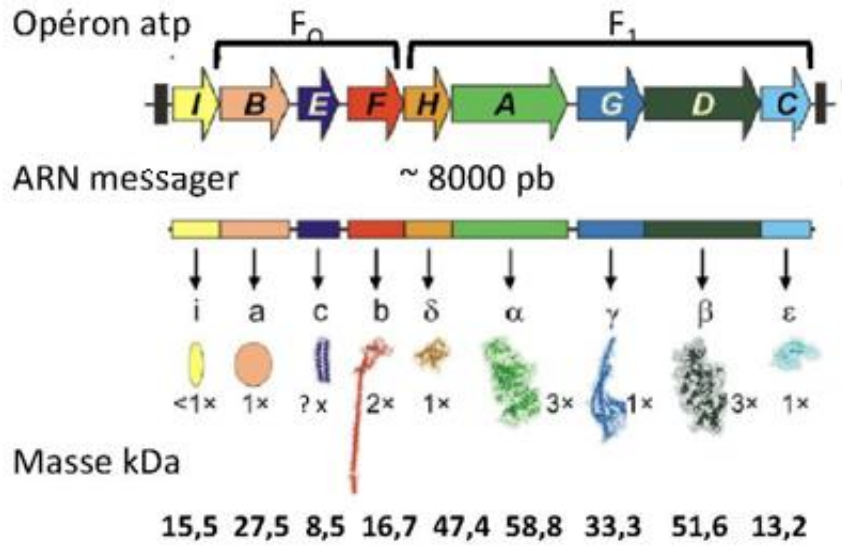


Figure 27. Organisation de l'opéron *atp*. L'opéron d'environ 8000 pb pour les mycobactéries est transcrit en un seul ARN messager. Neuf protéines sont traduites. Les modèles des sous-unités sont faits avec les PDB 2X2V, 1B9U, 3K5B, 2A7U, 2QE7 et 1E79. La masse des protéines correspond à la masse des protéines de *M. smegmatis*. Figure inspirée par le travail de (Matthies, Haberstock et al. 2011)

En amont de l'opéron *atp* se trouve un neuvième gène : le gène *atpI*. Ce gène code pour une protéine hydrophobe non-essentielle, contenant 4 hélices transmembranaires prédites, qui intervient probablement au moment de l'assemblage des sous-unités de l'ATP synthase (Hicks, Liu et al. 2010).

4.6.3. Régulation de l'ATP synthase mycobactérienne

Peu de choses sont connues sur la régulation transcriptionnelle de l'ATP synthase mycobactérienne. Les travaux de Sala et al (Sala, Haouz et al. 2009) ont montré la surexpression de l'ATP synthase de *M. tuberculosis* par des antibiotiques comme l'amoxicilline (les mycobactéries sont naturellement résistantes aux β-lactamine) via un système de régulation *blaI*/*blaR*. Ce système implique l'intervention du gène *blaI*, qui code pour un répresseur de la transcription, et du gène *blaR1*, qui code pour un récepteur transmembranaire (la nomenclature des gènes vient de *Bacillus licheniformis* chez lequel ce système a été décrit). En absence d'induction, le répresseur BlaI se fixe sur son site de liaison dans le chromosome. Quand une β-lactamine se lie sur le site de liaison dans le domaine extracellulaire de BlaR1, son domaine intracellulaire s'active et provoque la protéolyse de BlaI. La répression est donc levée et le(s) gène(s) en aval du site de régulation peut(vent) être transcrit(s) (Figure 28).

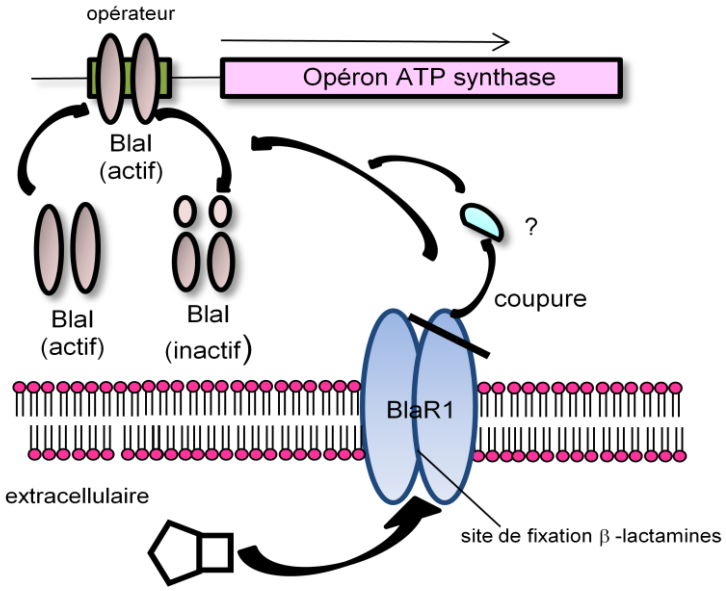


Figure 28. Mécanisme de régulation de BlaI/BlaR.

Chez *M. tuberculosis,* les homologues de *blaI* et de *blaR1* sont respectivement les gènes *rv1846c* et *rv1845c*. Une région opératrice pour Rv1846c a été identifiée en amont de l'opéron *rv1303-atpBEFHAGDC-rv1312,* qui est l'opéron *atp*. *Rv1845c* et ses orthologues mycobactériens ont la particularité de ne pas avoir de site de liaison extracellulaire pour les β-lactamines, présent dans le récepteur BlaR1. L'interaction avec l'antibiotique chez les mycobactéries doit donc se faire différemment, soit via la partie extracellulaire résiduelle ou via d'autres protéines membranaires.

4.6.4. Régulation de l'ATP synthase dans les bacilles en phase de dormance

La sous-expression de l'ATP synthase dans les mycobactéries en phase de dormance correspond à l'adaptation du bacille à une disponibilité limitée d'oxygène et à une diminution de la quantité d'énergie nécessaire à la cellule pour fonctionner. Dans ces conditions, le niveau d'ATP cellulaire est 10 fois plus bas par rapport aux conditions normales de croissance, mais, pour survivre, le bacille doit maintenir une production basale d'ATP via la respiration, ainsi qu'une membrane énergisée (Bald and Koul 2010). Ces deux caractéristiques différencient les mycobactéries de la plupart des autres bactéries chez lesquelles la dissipation du gradient protonique de membrane ou de l'activité ATP synthase n'est pas systématiquement bactéricide (Rao, Alonso et al. 2008; Hurdle, O'Neill et al. 2011). C'est pour cette raison que de nouvelles drogues inhibant l'oxydation du NADH ou la synthèse d'ATP, ou annulant la FPM sont des drogues candidates d'un grand intérêt pour cibler et éradiquer les bacilles dormants de *M. tuberculosis* (Bald and Koul 2010).

5. Objectifs du projet

En 2005, notre équipe a participé à l'identification d'une nouvelle famille d'antibiotiques: les diarylquinolines. Un des dérivés, le TMC207, est spécifiquement actif vis-à-vis d'un grand nombre de mycobactéries et plus particulièrement sur *Mycobacterium tuberculosis*. La découverte du TMC207 est une étape cruciale dans le développement de nouveaux antituberculeux en raison

des caractéristiques uniques de cette molécule qui est en phase de développement clinique II. Nous avons montré que la cible de ce nouvel antituberculeux est l'ATP synthase des mycobactéries et plus précisément la sous-unité c, codée par le gène *atpE.*

Ce projet de thèse vise à poursuivre l'étude fondamentale de l'ATP synthase des mycobactéries. Les résultats que nous avons obtenus en 2006 indiquent que l'interaction entre la drogue et la sous-unité c de l'ATP synthase pourrait se faire dans l'environnement immédiat du Glu61 (le résidu permettant le transfert de protons dans l'anneau c) conduisant ainsi à l'inhibition du fonctionnement de cette enzyme clé pour la production d'énergie des mycobactéries.

L'objectif principal de notre travail de thèse est de définir au niveau structural et biochimique le type d'interaction que fait le TMC207 avec sa cible. Nous avons débuté ce travail en nous focalisant sur l'étude microbiologique de mutants résistants à la drogue issus de différentes espèces mycobactériennes. L'effet des mutations identifiées sur le niveau de résistance a été étudié au sein des clones résistants, mais également à l'aide d'un système isogénique que nous avons construit à partir de *M. smegmatis*.

Une des observations découlant de l'étude microbiologique des clones résistants a été la mise en évidence de l'existence d'un autre mécanisme de résistance au TMC207 pouvant être en relation avec le niveau d'expression de l'ATP synthase. Dans le cadre de notre travail, nous avons cherché à caractériser cette surexpression par des techniques de RT-PCR.

En parallèle, nous avons travaillé sur la détermination *in silico* du domaine d'interaction du TMC207 sur l'ATP synthase. Ceci a pu être réalisé grâce à la construction d'un modèle structural de l'anneau c mycobactérien. L'analyse de ce modèle associé à l'interprétation des résultats obtenus précédemment nous a permis de cartographier le site d'interaction de la drogue au niveau de l'anneau c, et de determiner que le site de fixation du proton se superpose à celui de la drogue. Des simulations de docking de la molécule dans son site de fixation ont permis d'identifier les groupements essentiels à la stabilisation de la drogue. Nous

avons ainsi pu proposer une hypothèse sur le mode de fixation de l'antibiotique et sur son mécanisme d'inhibition.

Enfin, une partie importante de nos travaux a concerné la mise au point de l'expression et de la purification de l'anneau c et plus largement de l'ATP synthase entière des mycobactéries afin de pouvoir réaliser une étude structurale de l'enzyme native mais également de l'enzyme en complexe avec le TMC207. Les premières images obtenues en microscopie électronique en coloration négative montrent une ATP synthase complète et nous permettent d'envisager l'obtention d'une enveloppe à plus haute résolution. Cette enveloppe nous apportera des informations essentielles sur la structuration de l'ATP synthase, notamment le nombre de monomères c constituant l'anneau. Elle nous permettra également de visualiser la poche d'interaction du TMC207 avec l'anneau c.

MATERIEL ET METHODES

1. Techniques de Microbiologie

1.1. Sélection des mutants résistants au TMC207

Des clones résistants au TMC207 ont été sélectionnés *in vitro* à partir de 4 espèces mycobactériennes différentes : *M. tuberculosis, M. smegmatis, M. fortuitum* et *M. abscessus. M. tuberculosis* H37Rv et *M. smegmatis* mc^2155 sont des souches de référence. Les autres souches de *M. tuberculosis*, *M. abscessus* et *M. fortuitum* sont des souches cliniques issues de la collection du CNR.

Les milieux utilisés ont été

- BHI (Brain Heart Infusion) additionné de 0.5% Tween80 pour *M. smegmatis*
- 7H9 additionné de 10% OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase) pour *M. abscessus* et *M. fortuitum*
- 7H11 additionné de 10% OADC pour *M. abscessus, M. fortuitum* et *M. tuberculosis.*
- Dubos additionné de 10% OADC pour *M. tuberculosis*

La diarylquinoline TMC207 a été fournie par Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and Development.

Les mycobactéries atypiques (*M. smegmatis*, *M. abscessus* et *M*. *fortuitum*) ont été cultivées dans un milieu BHI-Tween80 ou 7H9-OADC. 100 µl de la culture ont été utilisés pour inoculer, soit directement soit après dilution d'un facteur 10 ou 100, du milieu BHI-Tween80 agar ou 7H11-OADC contenant des concentrations croissantes de TMC207 plus élevées que la CMI : de 0.003 µg/ml à 1 µg/ml pour *M. smegmatis* (CMI = 0.007 µg/ml), de 0.015 µg/ml à 0.5 µg/ml pour *M. fortuitum* (CMI = 0.01 µg/ml), et de 0.25 µg/ml à 8 µg/ml pour *M. abscessus* (CMI = 0.25 µg/ml). Des colonies résistantes ont été obtenues après 3 jours à 30°C.

M. tuberculosis a été cultivé pendant une semaine à 37°C dans 15 ml de milieu Dubos-OADC. Ces 15 ml ont été utilisés pour inoculer 300 ml du même milieu. Après 7 jours, 100 µl de ces cultures ont été utilisés pour inoculer, directement ou après dilution d'un facteur 10 ou 100, un milieu 7H11-OADC contenant des concentrations croissantes de TMC207 variant de 0,03 µg/ml à 0,5 µg/ml (CMI = 0.03 µg/ml). Les cultures ont été incubées à 37°C pendant 6 semaines.

1.2. Préparation des cellules électrocompétentes

Le protocole utilisé pour rendre les cellules de *M. smegmatis* électrocompétentes a été le même que celui utilisé pour *E. coli*. Les bactéries ont été cultivées dans un litre de milieu jusqu'à une densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) d'environ 0.7. Ensuite les cellules sont mises dans la glace 40 minutes et centrifugées à 2000 g pendant 15 minutes. Pour éliminer les sels, le culot bactérien est lavé 4 fois avec de l'eau stérile. Le culot final est repris dans 2 ml d'eau additionnée de 10% de glycérol et il est conservé à -80°C.

1.3. Transformation par électroporation de *M. smegmatis*

1.3.1. Transformation de *M. smegmatis* pour les tests de complémentation

La souche sauvage de *M. smegmatis* mc^2155 a été transformée par électroporation avec 50 ng des différents plasmides utilisés dans les tests de complémentation. Les bactéries transformées sont cultivées dans du milieu BHI additionné de 0.5% Tween80 et incubées 2 heures à 37°C avant de les étaler sur un milieu BHI-Tween agar contenant 100 µg/ml de zéocine. Les colonies apparaissent après 3-4 jours à 37°C. La présence du plasmide recombinant dans les colonies obtenues a été vérifiée par amplification et séquençage du gène *atpE* à partir d'amorces spécifiques du plasmide d'intérêt.

1.3.2. Transformation de *M. smegmatis* pour les tests d'inactivation

Les souches de *M. smegmatis* ont été transformées avec environ 2 µg du produit d'amplification par PCR de la cassette d'inactivation purifiés par Microcon 100 (Millipore), ou avec 100 ng du plasmide suicide non-traité, ou avec le vecteur traité selon différents méthodes :

- 50 ng ou 100 ng du vecteur traité 20, 50 ou 90 seconds aux UV
- 1 µl ou 3 µl d'environ 1 µg du vecteur traité à la soude selon Hinds J, et al. (Hinds, Mahenthiralingam et al. 1999)
- 2 µg du vecteur linéarisé avec *Not*I ou avec *Bgl*II

Les colonies transformées ont été incubées 3 heures à 37°C sous agitation avant d'être étalées sur une gélose BHI-Tween80 contenant 100 µg/ml de zéocine, permettant la sélection des clones contenant le vecteur de

complémentation pLYG204.zeo, et 12 µg/ml de kanamicine, permettant la sélection des colonies inactivées. Le nombre de copie du gène *aph* étant inferieur quand il est inséré dans le génome par rapport à quand il est porté par le plasmide, nous avons choisi de sélectionner les clones inactivés avec 12 µg/ml de kanamicine (concentration bactéricide pour *M. smegmatis* sauvage) même si une souche de *M. smegmatis* qui porte un vecteur contenant le gène *aph* est résistante à 100 µg/ml de kanamicine.

Trois souches de *M. smegmatis* complémentées ont été transformées : la souche complémentée avec la sous-unité c sauvage, la souche complémentée avec la sous-unité c mutée à la position 63 (A63P) et la souche complémentée avec la sous-unité c mutée à la position 66 (I66M).

1.4. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) du TMC207

1.4.1. Mesure de la CMI pour les clones résistants au TMC207

La concentration minimale inhibitrice (CMI) du TMC207 a été mesurée pour les colonies de *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis* résistantes à la drogue et mutées dans la sous-unité c, et pour toutes les colonies de *M. abscessus* (mutées et non mutées dans la sous-unité c). Les bactéries ont été cultivées sur un milieu 7H11-OADC contenant des concentrations croissantes de TMC207 variant entre 0.0007 µg/ml et 64 µg/ml. Les géloses ont été incubées à 30°C (pour *M. fortuitum*, *M. smegmatis* et *M. abscessus*) ou à 37°C (pour *M. tuberculosis*) pendant 6-40 jours (6-12 jours pour *M. fortuitum*, *M. smegmatis* et *M. abscessus*, 30-40 jours pour *M. tuberculosis*).

1.4.2. Mesure de la CMI pour les souches de *M. smegmatis* complémentées

Pour les tests de complémentation, les souches de *M. smegmatis* complémentées avec une sous-unité c mutée ont été cultivées à 37°C dans du milieu BHI-Tween jusqu'à une DO_{600} de 0.7-0.8 (5-8 h). 100 µl de culture ont ensuite été étalés sur un milieu agar BHI-Tween additionné de 100 µg/ml de zéocine et de concentrations croissantes de TMC207 (entre 0.0007 µg/ml et 32 µg/ml). Les géloses ont été incubées à 37°C pendant 5 jours.

2. Techniques de Biologie Moléculaire

2.1. Amplifications par Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1.1. Amplification des gènes *atpE* et *atpB* des clones résistants au TMC207

Les gènes *atpE* (sous-unité c de l'ATP synthase) et *atpB* (sous-unité a de l'ATP synthase) des mutants résistants au TMC207 sélectionnés *in vitro* ont été amplifiés et séquencés. L'ADN des mycobactéries mutantes a été extrait par choc thermique : 1 minute à 4°C et 1 minute à 100°C, 5 fois. L'amplification du gène *atpE* a été effectuée avec les amorces dégénérées atpBS et atpFAS (Petrella, Cambau et al. 2006). Les gènes *atpB* de *M. tuberculosis* et de *M. abscessus* ont respectivement été amplifiés avec les couples d'amorces atpBBKS-atpBBKAS et atpBABS_S-atpEABS_AS :

atpBS : TGTAYTTCAGCCARGCSATGG
atpFAS : CCGTTSGGDABGAGGAAGTTG
atpBBKS : ATGACTGAGACCATCCTGGCC
atpBBKAS : AATCGCGCTCACTTCACCCAT
atpBABS_S : TTCGGGGTTGCGTTGTTCCAGG
atpEABS_AS : AACAATTGTGGGGTCCGCCAT

2.1.2. Amplification de l'opéron *atp* de *M. tuberculosis*

L'opéron *atp* complet codant pour toutes les sous-unités de l'ATP synthase de trois souches de *M. tuberculosis* a été amplifié avec 8 couples d'amorces : opeatpBKS1 / atpBBKAS ; atpEBKLYGS / opeatpBKAS2 ; opeatpBKS3 / opeatpBKAS4 ; opeatpBKS5 / opeatpBKAS6 ; opeatpBKS7 / opeatpBKAS8 ; opeatpBKS9 / opeatpBKAS10 ; opeatpBKS11 / opeatpBKAS12 et opeatpBKS13 / opeatpBKAS14. Chaque couple permet l'amplification d'environ 1000 pb :

opeatpBKS1 : CGGGTGGTTTCCGCTCCATCA
opeatpBKAS2 : TGATGCG CTCCGCCTCGACGTC
opeatpBKS3 : AGCGCACCGTGTTGTGGAAG
opeatpBKAS4 : TAGATACGGCTCAGCACTTCGG
opeatpBKS5 : TGCGGTGGCTCGCCGCGGCGAAA
opeatpBKAS6 : TTTGAAACCGGCGGA CTCCGACGC
opeatpBKS7 : TCGGGCAGAAGGGAACTACCATCG
opeatpBKAS8 : GCTATTTCTTCTTCTTCGGCGCCGG
opeatpBKS9 : GCTTCGCGGCCACCGGTGGCGGCT
opeatpBKAS10 : ACCTAGCTTGGGCCTAGCGGGCTTC
opeatpBKS11 : ACGCTGATGGCAAACCGCGAGCG
opeatpBKAS12 : GCCAGCGTGGGCTGGTATCCCAC
opeatpBKS13 : CAAGACGTATTGCTGTTC ATCGACAACA

opeatpBKAS14 : ACAACGACGAGCACGACCATGCCGAT

2.1.3. Amplification de la région de régulation de l'opéron *atp* des clones de *M. abscessus* et *M. tuberculosis* résistantes au TMC207

Le site de fixation de BlaI dans la région de régulation de l'opéron atp de *M. tuberculosis* a été identifié par Sala et al. (Sala, Haouz et al. 2009). Le site homologue chez *M. abscessus* a été identifié par recherche de séquences homologues dans le génome de la bactérie (ID NCBI CU458896 http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Un couple d'amorces a été construit pour chaque espèce (aoabsS et aoabsAS pour *M. abscessus* et aoBKS et aoBKAS pour *M. tuberculosis*) afin d'amplifier environ 600 pb contenant ce site :

aoabsS : TCTATGGGTGGCGATCATCGCC
aoabsAS : GAAGACGCCGAACTGCCACTG
aoBKS : CATCGGCGCGTGGTCCTGATCAT
aoBKAS : CCAAGAACATCCCGACCGTCAGG

2.1.4. Amplification des gènes *rv1846c*, *rv1845c*, *mab_2414* et *mab_2415* des souches de *M. abscessus* et *M. tuberculosis* résistantes au TMC207

Les gènes *rv1846c* et *rv1845c* sont respectivement les homologues de *blaI* et *blaR* identifiés chez *M. tuberculosis* par Sala et al. (Sala, Haouz et al. 2009). Nous avons identifié leurs homologues chez *M. abscessus* par homologie de séquence protéique en utilisant BLASTP (Basic Local Alignment Search Tool – alignement d'une séquence protéique contre une base de données protéiques, http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Les gènes correspondants sont respectivement *mab_2415* et *mab_2414* pour *blaI* et *blaR*. Deux couples d'amorces ont été construites afin d'amplifier et de séquencer les différents gènes. Pour *M. tuberculosis* nous avons utilisé les amorces Rv1846c_S et Rv1846c_S pour amplifier le gène *rv1846c*, et les amorces Rv1845c_S et Rv1845C_AS pour le gène *rv1845c*. Pour *M. abscessus* nous avons utilisé les amorces MAB_2415_S et MAB_2415_AS pour le gène *mab_2415*, et les amorces 2MAB_2414_S et 3MAB_2415_AS pour le gène *mab_2414* :

Rv1846c_S : TACGCTGGTTTCAACCCGCAGG
Rv1846c_S : ATGGTGAAGGCCAGCGCGGCAC
Rv1845c_S : ATGGCAATCGGCCACCGGCT
Rv1845c_AS : CGAACTCATGTCCTGCCTTTCAG
MAB_2415_S : GATGTAGTACGGCATTGCGTCG

MAB_2415_AS : CAGCGCGAGTATCGCGAACG
2MAB_2414_S : CCGCACTGGTGCACTTCGTG
3MAB_2414_AS : TCACTTGCTGAAGAGGCGCTGAA

2.1.5. Analyse des clones de *M. smegmatis* obtenus dans le cadre de l'inactivation du gène *atpE*

Les colonies de *M. smegmatis* recombinantes obtenues dans les tests d'inactivation du gène *atpE* ont été analysées par PCR avec les couples d'amorces atpE1 et atpE4 ou atpFAS et atpBS (Petrella, Cambau et al. 2006) :

atpE1 : GGATCCGCGTTTGCTTCAAGAGTTCGGGC
atpE4 : GGATCCGAGTTCGCTCAGGAAGCGGT

Les amorces atpE1 et atpE4 (flèches oranges sur la Figure 29) s'hybrident uniquement dans le chromosome de *M. smegmatis* et permettent une amplification d'environ 2200 pb si le gène *atpE* n'a pas été inactivé, et d'environ 2900 pb s'il a été inactivé (Figure 29). Les amorces atpFAS et atpBS (flèches violettes sur la Figure 29) s'hybrident aux extrémités du gène *atpE* sur le chromosome mais aussi sur la cassette d'inactivation du vecteur suicide. Si le gène *atpE* n'a pas été inactivé une seule amplification sera visible à environ 500 pb, si il a été inactivé une seule amplification sera visible à environ 1200 pb. Dans le cas où le gène n'a pas été inactivé et le vecteur est inséré dans le génome par un seul événement de recombinaison, deux bandes seront visibles à environ 500 pb et 1200 pb (Figure 29).

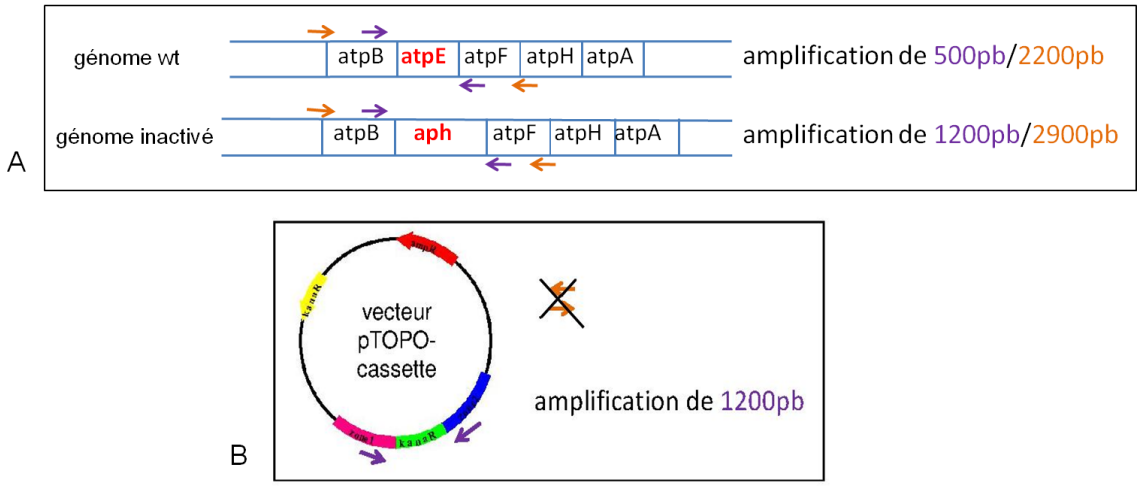


Figure 29. Schéma d'amplification par PCR avec les amorces atpFAS et atpBS (en violet) et atpE1 et atpE4 (en orange) pour les colonies recombinantes. (A) Position d'hybridation des amorces sur les génomes de *M. smegmatis*, (B) position d'hybridation sur le plasmide.

Une réaction d'amplification avec les amorces aphatpES et aphatpEAS a aussi été faite pour vérifier la présence du gène *aph* dans les colonies recombinantes :

aphatpES : TGACTAACTAGGAGGAATAAATGATTGAACAAGATGGA
aphatpEAS : TCATTATTCCCTCCAGGTATCAGAAGAACTCGTCAAGA

2.2. Séquençage des produits d'amplification

Les produits d'amplification ont été purifiés en utilisant une colonne Microcon 100 (Millipore) ou le kit QIAquick PCR purification (QIAGEN) et les réactions de séquence ont été préparées avec le kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Le séquenceur utilisé est un ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) disponible à la plateforme P3S de la Pitié Salpétrière. L'analyse des séquences a été faite à l'aide du logiciel SeqScape par comparaison aux séquences sauvages.

2.3. Southern Blot

2.3.1. Southern Blot pour déterminer le nombre de copie du gène *atpE* dans le génome de *M. smegmatis* et *M. tuberculosis*

L'ADN chromosomique de *M. smegmatis* mc^2155 a été extrait avec du phénol-chloroforme et l'ADN chromosomique de *M. tuberculosis* H37Rv avec du chloroforme-isoamylalcool et *N*-cetyl-*N*,*N*,*N*-trimethylammonium bronide (SIGMA). Le protocole détaillé est disponible dans l'article Petrella et al. (Petrella, Clermont et al. 2001).

Deux tests de digestion de l'ADN génomique mycobactérien ont été faits. Pour le premier test, la digestion enzymatique a été faite avec *Pst*I et *BstE*II pour *M. smegmatis* (les fragments produits contenant le gène *atpE* ont une taille de 3096 pb et 1700 pb, respectivement) et *Msc*I et *Nco*I pour *M. tuberculosis* (fragment de 1218 pb et 3668 pb, respectivement). Après digestions, les fragments obtenus sont séparés par migration sur un gel d'agarose 1% à 100 V pendant 15 minutes et à 40 V pendant 15 heures. Pour le deuxième test, le génome de *M. smegmatis* a été digéré avec les enzymes *Nhe*I et *Bgl*II afin d'obtenir des fragments de digestion de plus grand taille, de 56749 pb et de 27361 pb, respectivement. Ces fragments ont été séparés grâce à une électrophorèse en

champs pulsé. *M. smegmatis* a été cultivé dans 6 ml de milieu BHI-Tween jusqu'à une DO_{600nm} de 0.6 et ensuite centrifugé 5 minutes à 8000 g. Le culot bactérien a été lavé à l'eau, puis resuspendu dans 160 µl de tampon TrisHCl 10 mM pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 1 M et mis à 50°C. 160 µl d'agarose low melting point 2% (en TBE 0.5%) sont ajoutés à la solution. Une fois la solution bien homogène, elle a été coulée dans un moule permettant la préparation de plugs. La lyse bactérienne, la protéolyse et la digestion enzymatique ont été faites directement dans les plugs. Les paramètres de l'électrophores en champ pulsé sont : 0.5 seconds - 8 seconds pendant 18 h.

L'hybridation a été faite en utilisant comme sondes les amplicons marqués des gènes *atpE* de *M. smegmatis* et de *M. tuberculosis*.

2.3.2. Southern Blot pour l'analyse des clones de *M. smegmatis* obtenus lors des tests d'inactivation du gène *atpE*

Les colonies de *M. smegmatis* recombinantes obtenues dans les tests d'inactivation du gène *atpE* ont été analysées par Southern Blot. L'ADN génomique de chaque colonie recombinante a été extrait comme décrit dans le paragraphe 2.3.1 du matériel et méthodes et digéré avec *Bcl*I. Les sondes utilisées sont les produits d'amplification du gène *atpB*, du gène *aph*, et d'une portion du vecteur pCR2.1-TOPO. La position d'hybridation des trois sondes sur le génome de *M. smegmatis* sauvage ou sur le génome inactivé, ainsi que sur le plasmide utilisé pour l'inactivation après digestion, est présentée sur la Figure 30. Pour la sonde s'hybridant sur le gène *aph*, l'obtention d'un signal est possible dans deux cas : (1) si le gène *atpE* est inactivé par la cassette contenant le gène *aph,* nous obtiendrons un signal correspondant à un fragment de génome d'environ 2100 pb (Figure 30B), (2) si le plasmide d'inactivation est présent dans nos clones, la sonde pourra s'hybrider sur un des gènes *aph* porté par ce plasmide et un signal correspondant à un fragment d'environ 5000 pb sera obtenu (Figure 30C). Pour la sonde s'hybridant sur le gène *atpB*, l'obtention d'un signal est possible dans trois cas : (1) si le gène *atpE* chromosomique n'a pas été inactivé, nous obtiendrons un signal correspondant à un fragment d'environ 1200 pb (Figure 30B), (2) si le gène *atpE* chromosomique a été inactivé, nous obtiendrons un signal correspondant à un fragment d'environ 2100 pb (Figure 30B), (3) si le vecteur pTOPOcassette est présent, nous obtiendrons un signal

correspondant à un fragment d'environ 5000 pb (Figure 30C). Enfin, la sonde s'hybridant dans le vecteur pTOPOcassette permet d'obtenir un signal correspondant à un fragment d'environ 5000 pb si ce dernier est contenu dans le génome des clones testés.

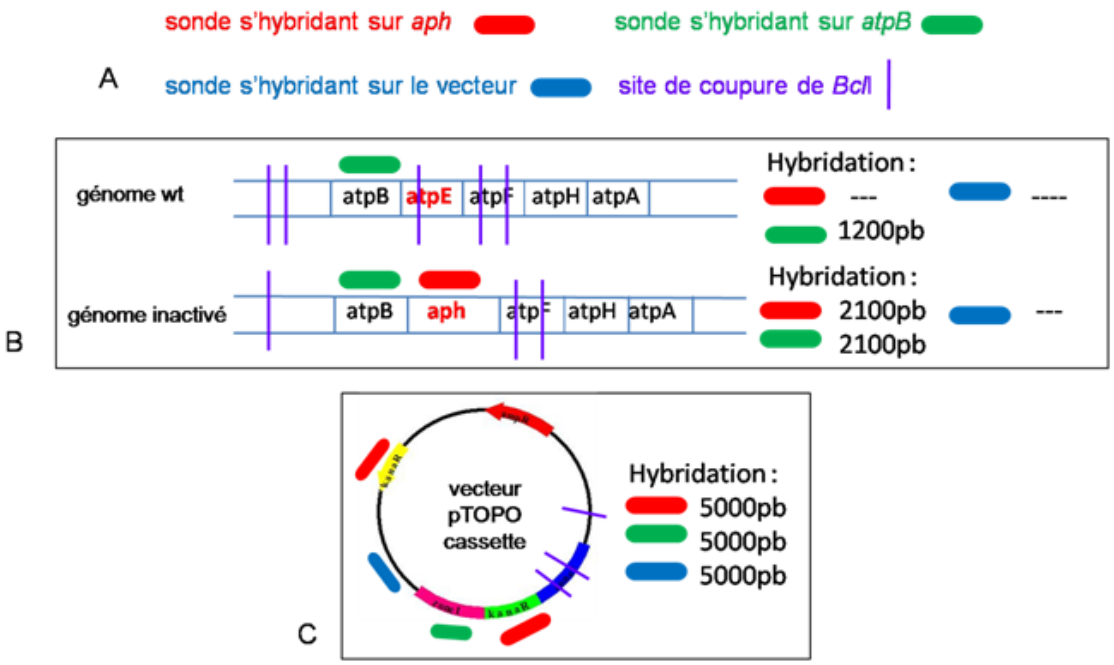


Figure 30. Position d'hybridation des sondes utilisées pour l'analyse en Southern Blot des colonies recombinantes obtenues. (A) Légende : en rouge la sonde qui s'hybride sur le gène *aph*, en vert la sonde qui s'hybride sur le gène *atpB*, en bleu la sonde qui s'hybride sur le vecteur et en violet les sites de coupure de *Bcl*I. (B) Position d'hybridation sur le génome de *M. smegmatis* sauvage et inactivé, (C) Position d'hybridation sur le vecteur d'inactivation.

2.3.3. Transfert des fragments de la digestion sur une membrane et hybridation de la sonde

Les gels d'agarose des migrations des fragments d'ADN digérés ont été traités avec 0.25 M HCl pendant 30 minutes, puis traités selon le protocole standard du Southern Blot pour être transférés par capillarité sur une membrane de nylon Hybond-N. L'hybridation a été faite en utilisant les sondes marquées avec le kit ECL « direct nucleic acid labeling system » (Amersham Life Science).

2.4. Les clonages

2.4.1. Les vecteurs pLYGatpEsme et pLYGatpEBK : clonage du gène *atpE* de *M. smegmatis* et de *M. tuberculosis* dans le vecteur pLYG204.zeo pour les tests de complémentation

2.4.1.1. Amplification du gène *atpE* de *M. smegmatis* et de *M. tuberculosis*

Le gène *atpE* de *M. smegmatis* et de *M. tuberculosis* a été amplifié par PCR avec les amorces atpEsmeLYGE et atpEsmeLYGS pour *M. smegmatis* et atpEBKLYGE et atpEBKLYGS pour *M. tuberculosis*. Ces amorces permettent d'amplifier les gènes et d'introduire à l'extrémité 5' un site de restriction pour l'enzyme *Sma*I (en rouge sur la séquence) et à l'extrémité 3' un site de restriction pour *Eco*RI (en vert), qui seront utilisés pour faciliter le clonage directionnel dans le vecteur pLYG204.zeo :

atpEsmeLYGS : TCCCCCGGGATCTCGATCCCAACGCCATCA
atpEsmeLYGE : GGAATTCTTACTGAAGGCCAGGAGTGGC
atpEBKLYGS : TCCCCCGGGACCCCACTATCGCTGCCGGCG
atpEKBLYGE : GGAATTCTTACTTGACGGGTGTAGCGAA

2.4.1.2. Premier clonage dans le vecteur pMOSBlue

Les gènes *atpE* de *M. smegmatis* et de *M. tuberculosis* après amplification ont été clonés dans le vecteur pMOSBlue selon le protocole du kit (carte du plasmide en annexe 1). Le vecteur pMOSBlue (Amersham Bioscience) est un plasmide de 2887 pb qui permet le clonage direct de produits de PCR. Le plasmide est fourni pré-linéarisé, les extrémités étant franches et déphosphorylées. Les produits de ligation ont ensuite été transformés dans des cellules ultracompétentes *E. coli* MOSBlue (résistantes à la tétracycline) par choc thermique (40 secondes à 42°C et 2 minutes dans la glace). Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur milieu agar BHI contenant de l'ampicilline (50 µg/ml) et de la tétracycline (15 µg/ml) supplémenté avec 35 µl de Xgal (50 mg/ml) et 20 µl d'IPTG (100 mM) afin de permettre la sélection bleu/blanc.

La vérification de la présence du gène dans les colonies sélectionnées a été faite par PCR et le vecteur a été extrait à l'aide du kit Plasmid Midi (Qiagen).

2.4.1.3. Clonage dans le vecteur pLYG204.zeo

Le gène *atpE* est ensuite cloné dans le plasmide pLYG204.zeo. L'étape de clonage dans le vecteur pMOSBlue est utile pour la création des extrémités compatibles entre l'insert (gène *atpE*) et le vecteur (pLYG204.zeo) afin de faciliter la ligation. La présence d'une extrémité franche et d'une extrémité cohésive après digestion permet aussi d'avoir un clonage directionnel.

Le plasmide pLYG204.zeo (carte en annexe 1) nous a été fourni par Jean-Marc Reyrat. Il est dérivé du vecteur pMV261.kan (Gao, Groger et al. 2003). C'est un vecteur shuttle de 3620 pb. Il contient une origine de réplication pour *E. coli* (oriE), une origine de réplication spécifique aux mycobactéries (oriM), un gène de résistance à la zéocine (zeo^R) et un promoteur fort mycobactérien. Grâce à ces caractéristiques il permet l'expression d'une protéine d'intérêt chez les mycobactéries et la manipulation de la construction plasmidique est facilitée grâce à l'origine de réplication chez *E. coli.*

Le plasmide pLYG204.zeo a été digéré avec les enzymes *Eco*RI et *Msc*I 16 heures à 37°C. Le vecteur linéarisé a été déposé sur un gel d'agarose 1%, découpé et extrait du gel grâce au kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Le plasmide pMOSBlue contenant le gène *atpE* a été digéré avec les enzymes *Eco*RI et *Sma*I. L'insert digéré a été déposé sur un gel agarose 1% et extrait avec le même kit. Même si l'insert et le vecteur n'ont pas été digérés avec les mêmes enzymes, les deux enzymes *Msc*I et *Sma*I génèrent des fragments avec des extrémités franches compatibles pour le clonage d'un insert *Sma*I-*atpE*-*Eco*RI dans un vecteur *Msc*I-pLYG204.zeo-*Eco*RI. L'utilisation de *Sma*I nous assure le clonage du gène *atpE* en phase avec le codon start du promoteur Hsp60 du plasmide (Figure 31).

Séquence du gène a*tpE* de *M. smegmatis* :
atg gat ctc gct ccc aac gcc atc…
Séquence du vecteur pLYG204.zeo :
…gaggaatcacttcgcaatggccaagacaattg…
Séquence du vecteur pLYG204.zeo avec le gène *atpE* cloné :
…acttcgca atg ggg gat ctc gct ccc aac gcc atc…

Figure 31. En gris la séquence du gène *atpE* de *M. smegmatis* ; en rouge la séquence du promoteur Hsp60 du vecteur pLYG204.zeo, en vert le site de coupure de *Msc*I, en fuchsia le site de coupure de *Sma*I ; la même technique a été utilisée pour le gène *atpE* de *M. tuberculosis*.

Les réactions de ligation ont été faites avec un rapport vecteur/insert de 1/1 et 1/3 dans un volume final variant de 20 µl à 35 µl en fonction de la concentration de l'insert. 4 µl de T4 DNA ligase (1U/µl – Usb) ont été utilisés et la ligation des extrémités franches a été favorisée avec 1.5 µl de NaCl 2 M et 1 µl de PEG 4K 50%. Les réactions ont été incubées 16 heures à 16°C. La réaction de ligation a été dialysée une heure afin d'éliminer les sels pouvant gêner l'électroporation. 40 µl de cellules *E. coli* TOP10 ont été transformées avec 4 µl de la réaction et étalées sur une gélose BHI additionnée de 25 µg/ml de zéocine. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures.

Afin de vérifier la présence de l'insert dans le plasmide recombinant, les colonies obtenues ont été testées par PCR en utilisant les amorces pLYG204 (GGTTTCATCCCCGATCCGGAG) et atpEsmeLYGE pour le gène *atpE* de *M. smegmatis* et les amorces pLYG204 et atpEBKLYGE pour le gène a*tpE* de *M. tuberculosis* (voir séquences des amorces page 74). Les deux plasmides pLYG204.zeo contenant chacun le gène *atpE* de *M. smegmatis* ou de *M. tuberculosis* (appelés respectivement pLYGatpEsme et pLYGatpEBK – carte en annexe 1) ont été extraits par miniprep avec le kit High Pure Plasmid Isolation (Roche).

2.4.2. Clonage du gène *atpD* de *M. smegmatis* dans le vecteur pLYG204.zeo pour les tests d'expression et purification de l'ATP synthase : vecteur pLYGatpDsme6H

Le gène *atpD* qui code pour la sous-unité β de *M. smegmatis* a été amplifié avec les amorces pLYGatpDS et pLYGatpDAS :

pLYGatpDS : CCGGGGGCATCATCACCATCACCACACTGCTACTGCAGAAAAGACCGC
pLYGatpDAS : AAGCTTTCACAGCTTGGCGCCGAGGCTCT

La technique de clonage est celle décrite dans le paragraphe 2.4.1. Les amorces de la PCR permettent l'introduction aux extrémités du gène *atpD* des sites de restriction pour *Sma*I (en fuchsia dans la séquence) et *Hind*III (en bleu) qui vont permettre la ligation dans le vecteur pLYG204.zeo (avec un rapport 1:1) après une étape de sous-clonage dans le vecteur pMOSBlue. L'amorce sens permet l'introduction de 6 codons histidine en N-terminal du gène (en vert sur la séquence).

La construction a été séquencée afin de confirmer l'absence de mutation dans le gène *atpD* et son insertion correcte juste après le promoteur Hsp60 du plasmide. Le plasmide ainsi obtenu appelé pLYGatpDsme6H (carte en annexe 1) a été extrait avec le kit High Pure Plasmid Isolation (Roche).

4 µl du plasmide ont été transformés dans une souche de *M. smegmatis* sauvage par électroporation et les bactéries recombinantes ont été sélectionnées sur milieu BHI-Tween80 agar additionné de 100 µg/ml de zéocine.

2.4.3. Clonage du gène *atpE* de *M. tuberculosis* dans le vecteur pET29a pour les tests d'expression et purification de l'ATP synthase : vecteurs pET29atpEBK et pET29atpEBK6H

Le gène *atpE* de *M. tuberculosis* a été cloné dans le vecteur pET29a (carte en annexe 1). Une première construction permet l'expression d'une sous-unité c sans tag (vecteur pET29atpEBK) et une deuxième permet l'expression d'une sous-unité c avec un His-Tag en C-terminale (vecteur pET29atpEBK6H). Le gène *atpE* a été amplifié par PCR avec les amorces atpEBKNde et atpEBKHindCT pour le clonage sans tag, et avec les amorces atpEBKNde et atpEBKHind pour le clonage avec His-Tag :

atpEBKNde : GGGGAATTC**CATATG**GACCCCACTATCGCTGCC
atpEBKHindCT : TAT**AAGCTT**CCCTTACTTGACGGGTGTAGCGAA
atpEBKHind : TAT**AAGCTT**CCCGTACTTGACGGGTGTAGCGAA

L'amorce atpEBKNde permet l'introduction d'un site de restriction pour *Nde*I (en bleu dans la séquence) à l'extrémité N-terminale du gène, tandis que les amorces atpEBKHindCT et atpEBKHind permettent l'introduction d'un site pour *Hind*III (en fuchsia dans les séquences) à l'extrémité C-terminale. L'amorce atpEBKHindCT permet l'amplification d'un gène *atpE* sans codon de terminaison, ce qui permettra après clonage dans le vecteur pET29a la production d'une sous-unité c avec 6 histidines en C-terminal (codons portés par le plasmide). Les deux produits d'amplification ont été clonés dans un premier temps dans le vecteur pCR2.1-TOPO selon le protocole du kit, digérés et ensuite clonés dans le vecteur pET29a.

Les constructions ont été séquencées afin de confirmer l'absence de mutation dans le gène *atpE* et son insertion correcte dans les plasmides. Les vecteurs pET29atpEBK et pET29atpEBK6H (carte en annexe 1) ainsi obtenu ont

été extraits avec le kit High Pure Plasmid Isolation (Roche) et transformés dans plusieurs souches de *E. coli* (BL21, BL21 Codon Plus, C43 et C44).

2.4.4. Clonage du gène *atpE* de *M. tuberculosis* dans le vecteur pET28a pour les tests d'expression et purification de l'ATP synthase : vecteur pET28atpEBK6H

Le gène *atpE* de *M. tuberculosis* a été cloné dans le vecteur pET28a (carte en annexe 1) permettant l'expression d'une sous-unité c avec un His-Tag en N-terminal. Le gène *atpE* a été amplifié par PCR avec les amorces atpEBKNde et atpEBKHind.

Le produit d'amplification par PCR a été cloné dans le vecteur pCR2.1-TOPO selon le protocole du kit avant d'être digéré et cloné dans le vecteur pET28a pour obtenir le plasmide pET28atpEBK6H (carte en annexe 1).

La construction a été séquencée afin de confirmer l'absence de mutation dans le gène *atpE* et son insertion correcte dans le plasmide en phase avec les codons 6 histidines. Le plasmide pET28atpEBK a été extrait avec le kit High Pure Plasmid Isolation (Roche) et transformé dans plusieurs souches de *E. coli* (BL21, BL21 Codon Plus, C43 et C44).

2.5. Mutagénèse dirigée

2.5.1. Mutagénèse dirigée des vecteurs de la complémentation génique

Pour les tests de complémentation, des réactions de mutagénèse dirigée ont été faites afin d'introduire des mutations dans le gène *atpE* sauvage cloné dans les vecteurs pLYGatpEsme et pLYGatpEBK. Chaque mutation a été faite dans le gène *atpE* de *M. tuberculosis* ou de *M. smegmatis* afin de reproduire celles qui ont été identifiées dans les mutants résistants au TMC207 et dans les espèces naturellement résistantes (Tableau 7).

Gène dans le vecteur pLYG204.zeo	Mutation dans le gène	Mutation dans la protéine
atpE de *M. smegmatis*	C210G	I66M
	A95T	D32V
	G199C	A63P
	A95G	D32G
	A195C	E61D
	C187G	L59V
	G199A et C200T	A63M
atpE de *M. tuberculosis*	G187C	A63P
	A83G	D32G
	G183C	E61D
	T175G	L59V
	C198G	I66M

Tableau 7. Modifications nucléotidiques introduites dans le gène *atpE* sauvage de *M. smegmatis* et de *M. tuberculosis* et mutations correspondantes induites dans la sous-unité c.

Nous avons utilisé le kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) pour muter le gène *atpE* sauvage. Deux oligonucléotides ont été construits pour chaque mutation, s'hybridant sur les brins sens et antisens de façon à encadrer la région de la mutation.

Les oligonucléotides utilisés pour muter le gène *atpE* de *M. smegmatis* sont les suivants (dans le nom de chaque séquence est indiquée la mutation produite dans la sous-unité c) :

atpEsmeI66MS : GCCGCGTACTTCATGAACCTGGCCTTCATGGCG
atpEsmeI66MAS : CGCCATGAAGGCCAGGTTCATGAAGTACGCGGC
atpEsmeD28GS : GCCGGTATCGGCGGCGGTATCGCGGGTAACGCG
atpEsmeD28GAS : CGCGTTACCCGCGATACCGCCGCCGATACCGGC
atpEsmeD28VS : GCCGGTATCGGCGTCGGTATCGCGGGTAACGCG
atpEsmeD28VAS : CGCGTTACCCGCGATACCGACGCCGATACCGGC
atpEsmeD28AS : GCCGGTATCGGCGCCGGTATCGCGGGTAACGCG
atpEsmeD28AAS : CGCGTTACCCGCGATACCGGCGCCGATACCGGC
atpEsmeE61DS : GTCGGTCTGGTGGACGCCGCGTACTTCATC
atpEsmeE61DAS : GATGAAGTACGCGGCGTCCACCAGACCGAC
atpEsmeA63PS : GGTCTGGTGGAAGCCCCGTACTTCATCAACCTGGCC
atpEsmeA63PAS : GGCCAGGTTGATGAAGTACGGGGCTTCCACCAGACC
atpEsmeL59VS : CCGTTCTTCATCACCGTCGGTGTGGTGGAAGCCGCGTA
atpEsmeL59VAS : TACGCGGCTTCCACCACACCGACGGTGATGAAGAACGG
atpEsmeA63MS : GGTCTGGTGGAAGCCATGTACTTCATCAACCTGGCC
atpEsmeA63MAS : GGCCAGGTTGATGAAGTACATGGCTTCCACCAGACC

Les oligonucléotides utilisés pour muter le gène *atpE* de *M. tuberculosis* sont les suivants :

atpEBKA63PS : GGTTTGGTTGAGGCGCCATACTTCATCAACCTGGCG
atpEBKA63PAS : CGCCAGGTTGATGAAGTATGGCGCCTCAACCAAACC
atpEBKE61DS : GTCGGTTTGGTTGACGCGGCATACTTCATCAAC
atpEBKE61DAS : GTTGATGAAGTATGCCGCGTCAACCAAACCGAC
atpEBKL59VS : CGTTCTTCATCACCGTCGGTGTGGTTGAGGCGGCATAC
atpEBKL59VAS : GTATGCCGCCTCAACCACACCGACGGTGATGAAGAACG
atpEBKI66MS : GCGGCATACTTCATGAACCTGGCGTTTATGGCG
atpEKI66MAS : CGCCATAAACGCCAGGTTCATGAAGTATGCCGC
atpEBKD28GS : GCCGGTATCGGTGGCGGTGTCGCCGGTAACGCG
atpEBKD28GAS : CGCGTTACCGGCGACACCGCCACCGATACCGGC

Les plasmides mutés ont été transformés dans *E. coli* TOP10 par électroporation. Les cellules ont été étalées sur un milieu BHI contenant de la zéocine (25 µg/ml) et incubées 24 heures à 37°C. La présence de la mutation a été vérifiée par amplification et séquençage du gène. Les différents vecteurs pLYGatpE mutés ont ensuite été extraits par miniprep avec le kit Pure Plasmid Isolation (Roche).

2.5.2. Mutagénèse dirigée pour la construction d'un plasmide d'expression de la sous-unité c de *M. smegmatis* avec un His-Tag

Le plasmide pLYGatpEsme a été muté afin d'introduire un tag de 6 histidines (His-Tag) à l'extrémité C-terminale de la protéine. Les 18 nucléotides codant pour le His-Tag ont été introduits grâce au kit QuickChange Site Directed Mutagenesis (Stratagene) avec deux réactions. Les oligonucléotides utilisés sont (les trois premiers codons histidine sont en vert, les trois derniers codons histidine sont en fuchsia et le codon stop du gène *atpE* est en bleu) :

histagatpEsme1s : CTCCTGGCCTTCAG**CATCATCAC**TAAGAATTCGAAGC
histagatpEsme1as : GCTTCGAATTCTTA**GTGATGATG**CTGAAGGCCAGGAG
histagatpEsme2s : GCCTTCAG**CATCATCACCATCACCAC**TAAGAATTCGAAGC
histagatpEsme2as : GCTTCGAATTCTTA**GTGGTGATGGTGATGATG**CTGAAGGC

La construction a été vérifiée chez *E. coli* avant de transformer le plasmide obtenu (pLYGatpEsme6H – carte en annexe 1) dans une souche sauvage de *M. smegmatis*.

2.6. Construction d'une cassette d'inactivation du gène *atpE* de *M. smegmatis*

Les trois étapes permettant la construction de la cassette d'inactivation sont résumées sur la Figure 32 :

- Amplification de 1000 pb en amont et en aval du gène *atpE* de *M. smegmatis*
- Amplification du gène *aph*
- Long-flanking homology PCR (Wach 1996) pour la ligation des trois séquences

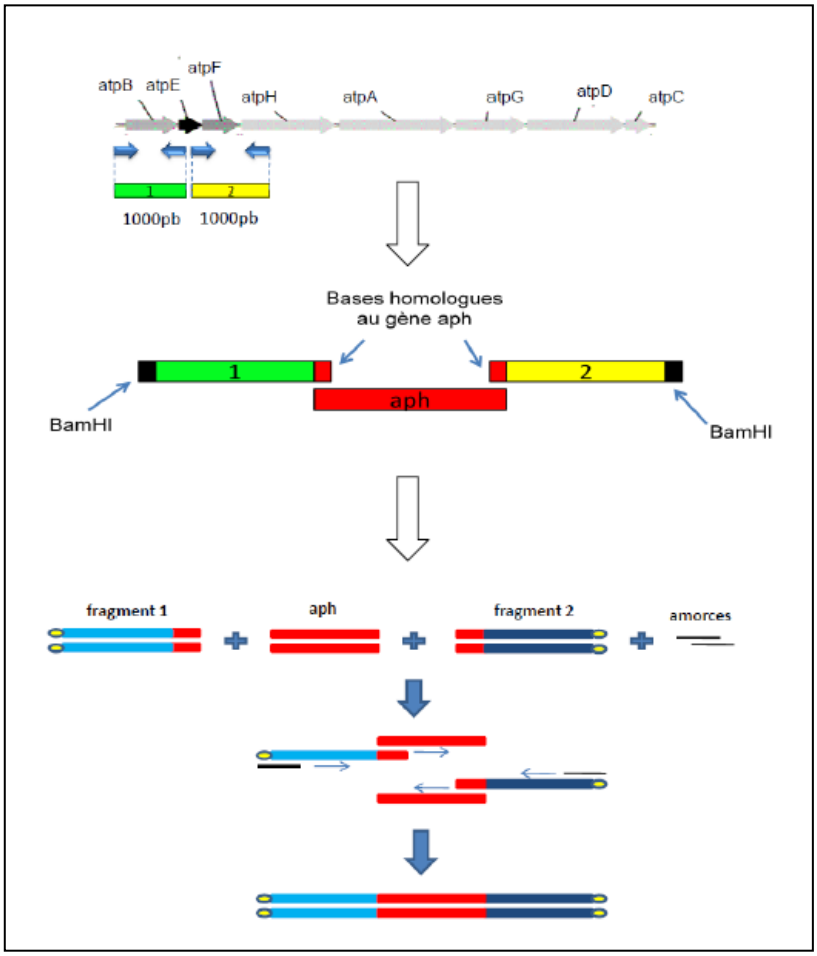


Figure 32. Schéma des étapes de la construction d'une cassette d'inactivation pour le gène *atpE* de *M. smegmatis.*

2.6.1. Amplification de 1000 pb en amont et en aval du gène *atpE* de *M. smegmatis* et amplification du gène *aph*

Nous avons amplifié à partir de l'ADN chromosomique de *M. smegmatis* deux fragments de 1000 pb correspondant à 35 pb du début du gène *atpE* et à la région en amont du gène (fragment 1) et à 18 pb de la fin du gène *atpE* et à la

région en aval de ce gène (fragment 2) (Figure 32). Nous avons utilisé les amorces atpE1 et atpE2 pour amplifier le fragment 1 et les amorces atpE3 et atpE4 pour le fragment 2 :

atpE1 : GGATCCGCGTTTGCTTCAAGAGTTCGGGC
atpE2 : AATCATTTATCCTCCTAGTTAGTCACGCCGGCCGTGATGATGGCGTT
atpE3 : CTTCTGATACCTGGTGGGAATAATGACTCCTGGCCTTCAGTAA
atpE4 : GGATCCGAGTTCGCTCAGGAAGCGGT

Le gène de résistance à la kanamycine (*aph)* a été amplifié à partir du plasmide pk19 avec les amorces aphatpES et aphatpEAS construites comme décrit par Ménard et al. (Menard, Sansonetti et al. 1993) :

aphatpES : TGACTAACTAGGAGGAATAAATGATTGAACAAGATGGA
aphatpEAS : TCATTATTCCCTCCAGGTATCAGAAGAACTCGTCAAGA

La cassette d'inactivation est constituée du gène *aph* encadré par les fragments 1 et 2. Les amorces atpE1 et atpE4 contiennent un site de restriction pour l'enzyme *Bam*HI (en vert) utile pour la ligation dans le plasmide pGOAL19. Les amorces atpE2 et atpE3 contiennent 26 pb en commun avec le gène *aph* (en rouge) nécessaires pour la réaction de long-flanking homology (LFH) – PCR.

2.6.1. Long-flanking homology (LFH)- PCR

La LFH-PCR est une PCR qui permet la ligation d'au moins deux produits de PCR (Wach 1996). Ceci est possible grâce à la présence d'un nombre de bases communes entre les fragments que l'on veut associer. Dans notre cas, les trois fragments que l'on veut associer sont les 1000 pb en amont (fragment 1) et en aval (fragment 2) du gène *atpE* de *M. smegmatis* ainsi que le gène *aph* (Figure 33).

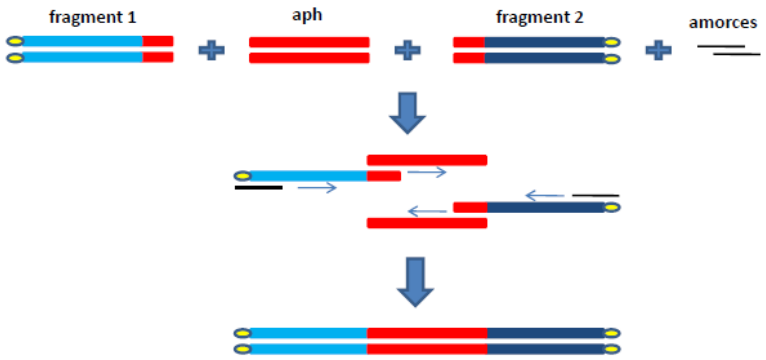


Figure 33. Schéma de la réaction de LFH-PCR.

Les trois produits de PCR, fragment 1, *aph* et fragment 2 ont été purifiés en utilisant une colonne Microcon 100 (Millipore). La réaction de LFH-PCR a été faite avec un rapport [fragment 1 : *aph* : fragment 2] de 1:2:1 et en utilisant les amorces atpE1 et atpE4. Les cycles de la réaction ont été : 15 minutes 95°C, 10 cycles de 30 seconds 94°C – 40 seconds 60°C – 5 minutes 72°C, 25 cycles de 30 seconds 94°C - 40 seconds 60°C – 5 minutes + 40 seconds tous les 2 cycles 72°C, 10 minutes 72°C. Le produit de PCR final, représentant la cassette d'inactivation du gène *atpE*, fait environ 2900 pb.

2.7. Construction d'un vecteur d'inactivation

2.7.1. Première stratégie pour la construction du vecteur suicide

Résumé des étapes (Figure 34) :

- Clonage de la cassette d'inactivation dans le vecteur pCR2.1-TOPO
- Clonage de la cassette d'inactivation dans le vecteur pGOAL19

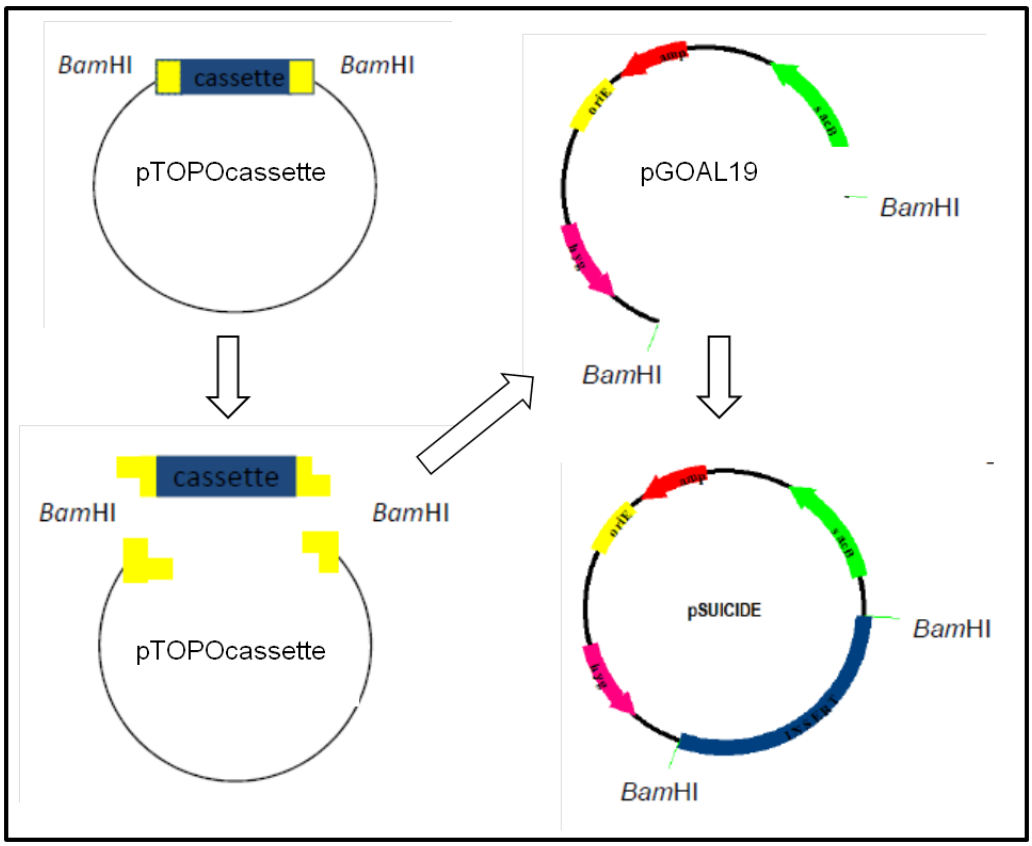


Figure 34. Schéma des étapes de la première stratégie pour la construction du vecteur d'inactivation.

2.7.1.1. Clonage de la cassette d'inactivation dans le vecteur pCR2.1-TOPO

La cassette d'inactivation du gène *atpE* amplifiée par LFH-PCR a été extraite d'un gel d'agarose 1% avec le kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Elle a ensuite été réamplifiée avec les amorces atpE1int et atpE4int avant d'être clonée dans le vecteur pCR2.1-TOPO (carte en annexe 1 - Invitrogen) selon le protocole du kit. Ces amorces contiennent un site de restriction pour l'enzyme *Bam*HI (en vert) :

atpE1int : **GGATCC**CTGGTGATGAGACCAGCAT
atpE4int : **GGATCC**ACGATCTCGGCGGCCTTGTT

Le vecteur ainsi obtenu, appelé pTOPOcassette (Figure 34), a été transformé dans *E. coli* TOP10 par électroporation et les colonies sélectionnées sur milieu BHI contenant 50 µg/ml d'ampicilline.

2.7.1.2. Clonage de la cassette d'inactivation dans le vecteur pGOAL19

Le vecteur pGOAL19 (Figure 34, carte en annexe 1) est un outil créé dans le but d'inactiver des gènes chez les mycobactéries (Parish and Stoker 2000) et il nous a été fourni par T. Parish du Département des Maladies Infectieuses et Tropicales de la London School of Hygiene and Tropical Medecine de Londres. Il contient une origine de réplication pour *E. coli*, un gène de résistance à l'ampicilline, un gène de résistance à l'hygromycine et un gène de sensibilité au sucrose. Tous les gènes marqueurs (sauf le gène de résistance à l'ampicilline) sont précédés d'un promoteur fort pour les mycobactéries.

Le vecteur pGOAL19 a été digéré avec l'enzyme de restriction *Bam*HI (37°C pendant 16 heures) et ses extrémités ont été déphosphorilées avec 1 U de shrimp alkaline phosphatase (Roche) 1 heure à 37°C afin d'empêcher une ligation sur lui-même.

La cassette d'inactivation contient trois sites de coupure pour *Bam*HI : deux sites aux extrémités insérés avec les amorces de la PCR et un site interne à la séquence. Le plasmide pTOPOcassette a été digéré partiellement (6 minutes à 37°C) avec *Bam*HI de façon à récupérer une cassette digérée seulement aux extrémités. En parallèle, une réaction de mutagénèse a également été faite avec

le kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene) afin d'éliminer le site *Bam*HI à l'intérieur de la séquence avec les oligos atpFmutS et atpFmutAS :

atpFmutS : GCTGGCCAGCAGGATTCTCGGCGTCGACGTG
atpFmutAS : CACGTCGACGCCGAGAATCCTGCTGGCCAGC

Les réactions de ligation entre le vecteur pGOAL19 et la cassette d'inactivation digérés *Bam*HI ont été faite à 4°C pendant 16 heures. Plusieurs rapport vecteur:insert ont été utilisés : 1:0.5, 1:1, 1:3, 1:5, 1:8, et 1:10. Les ligations (pSUICIDE, Figure 34) ont été ensuite dialysées avant d'être transformées dans des cellules électrocompétentes de *E. coli* TOP10.

2.7.2. Deuxième stratégie pour la construction du vecteur suicide

Résumé des étapes (Figure 35) :

- Amplification de 1000 pb en amont et en aval du gène *atpE* de *M. smegmatis*
- Amplification du gène *aph*
- Clonage de chaque fragment dans le vecteur pCR2.1-TOPO
- Clonage de chaque fragment dans le vecteur p2NIL
- Insertion des marqueurs de sélection dans le vecteur p2NIL+cassette d'inactivation (p2NILIII)

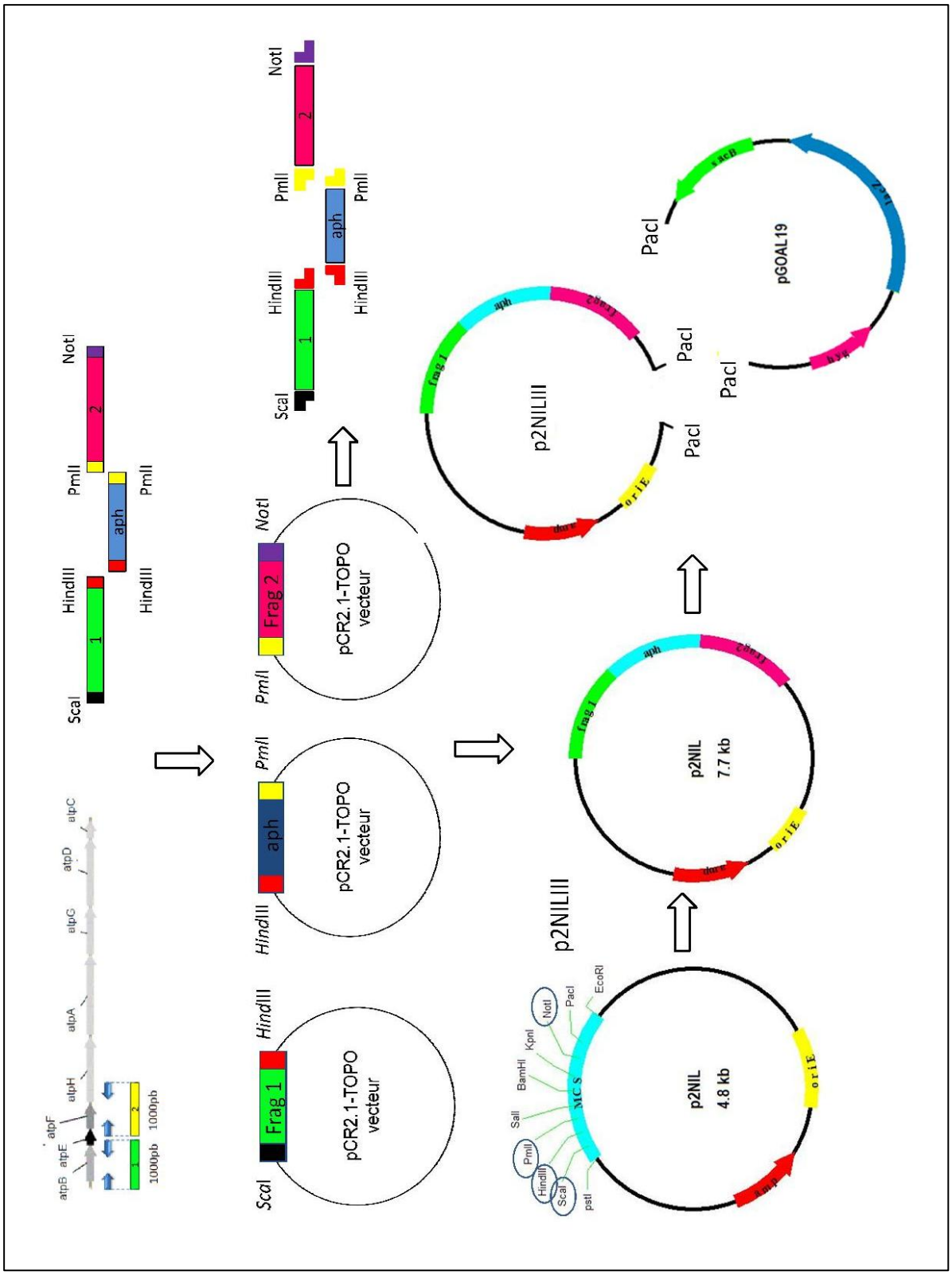


Figure 35. Schéma des étapes de la deuxième stratégie pour la construction du vecteur d'inactivation.

2.7.2.1 Amplification de 1000 pb aux extrémités du gène *atpE* de *M. smegmatis* et amplification du gène *aph*

Nous avons amplifié par PCR 1000 pb en amont et en aval du gène *atpE* de *M. smegmatis* (Figure 35) à partir du chromosome de *M. smegmatis* en utilisant les amorces atpEScaI, atpE2HindIII, atpE3PmlI, atpE4NotI :

atpE1ScaI : AGTACTGCGTTTGTCTTCAAGAGTTCGG
atpE2HindIII : AAGCTTGCCGGCCGTGATGATGGCGTT
atpE3PmlI : CACGTGACTCCTGGCCTTCGTAATCCG
atpE4NotI : GCGGCCGCAGTTCGCTCAGGAAGCG

Le gène *aph* a été amplifié à partir du plasmide pk19 avec les amorces aphatpESHindIII et aphatpEASPmlI construites comme décrit par Ménard et al. (Menard, Sansonetti et al. 1993) :

aphatpESHindIII : AAGCTTTGACTAACTAGGAGGAATAAATGATTGAACAAGATGGA
aphatpEASPmlI : CACGTGCATTATTCCCTCCAGGTATCAGAAGAACTCGTCAAGA

Les 6 amorces contiennent à chaque extrémité un site de coupure unique dans la séquence de la cassette d'inactivation, unique dans la séquence du vecteur p2NIL et absent dans le vecteur pCR2.1-TOPO.

2.7.2.2. Clonage dans le plasmide pCR2.1-TOPO

Les trois produits d'amplification obtenus, c'est-à-dire les 1000 pb en amont du gène *atpE* (fragment 1), le gène *aph* et les 1000 pb en aval du gène *atpE* (fragment 2), ont été clonés séparément dans le vecteur pCR2.1-TOPO selon le protocole du kit (Figure 35).

Après extraction de chaque plasmide avec le kit Plasmid Midi (Qiagen), la digestion de chaque insert a été faite en deux étapes avec les enzymes appropriées : *Sca*I et *Hind*III pour le vecteur contenant le fragment 1, *Hind*III et *Pml*I pour celui contenant *aph* et *Pml*I et *Not*I pour celui contenant le fragment 2.

2.7.2.3. Clonage dans le vecteur p2NIL

Après digestion, chaque insert possède des extrémités digérées qui vont permettre la ligation des inserts entre eux et dans le vecteur p2NIL (carte du vecteur en annexe 1), soit avec trois réactions de ligation différentes, soit avec une ligation multiple. Le vecteur p2NIL, comme le vecteur pGOAL19, nous a été

fourni par Parish T. du Département des Maladies Infectieuses et Tropicales de la London School of Hygiene and Tropial Medecine de Londres.

Les réactions de ligation ont été faites à 4°C ou à 16°C pendant 16 heures. Pour la ligation simultanée des trois fragments, un rapport vecteur:inserts de 1:1:1:1 a été utilisé, et pour les ligations indépendantes de chaque fragment des rapports 1:2 et 1:5.

2.7.2.4. Insertion des autres marqueurs de sélection dans le plasmide p2NIL contenant la cassette d'inactivation

Le plasmide pGOAL19 a été digéré avec l'enzyme *Pac*I. Cela permet la linéarisation de l'ADN portant les trois marqueurs de sélection contenus dans le vecteur : le gène de résistance à l'hygromycine, le gène de sensibilité au sucrose, et le gène LacZ. L'ADN linéaire contenant les gènes marqueurs a été cloné dans le vecteur p2NIL+cassette d'inactivation (p2NILIII) linéarisé PacI (Figure 35).

2.8. Reverse Transcription - PCR en temps réel

2.8.1. Extraction de l'ARN total de *M. abscessus*

Nous avons extrait l'ARN cellulaire total de 3 souches de *M. abscessus* résistantes au TMC207 mais non-mutées dans la sous-unité c (souches 3.1, 5.1 et 1.05), de 2 souches de *M. abscessus* résistantes à la drogue et mutées dans la sous-unité c (souche A4 portant la substitution A63P et la souche A6 portant la substitution D32A) et de la souche sauvage de *M. abscessus*.

Toutes les souches, sauf la souche sauvage, ont été cultivées en présence et en absence de 1 µg/ml de TMC207. Les bactéries ont été cultivées dans 50 ml de milieu 7H9-OADC sur la nuit avant de lancer des cultures de 100 ml d'une DO_{600nm} initiale de 0.2. Quand la DO_{600nm} est de 0.4 (4-9 heures), la croissance des bactéries est arrêtée à 4°C. L'extraction de l'ARN et la digestion de l'ADN contaminant ont été faites grâce au kit RiboPure^{TM}-Bacteria (Ambion) avec une modification dans le protocole due aux caractéristiques de membrane des mycobactéries: le temps de cassage des bactéries avec les billes de zircone est de 1 heure 30-2 heures à la place de 10 minutes. La concentration de l'ARN purifié est mesurée au NanoDrop, puis l'échantillon est conservé à -80°C. Sa

pureté est mesurée par le rapport A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230}, qui doivent être compris entre 1.8 et 2.1.

2.8.2. Réaction de RT-PCR en temps réel - TaqMan

Nous avons vérifié la quantité d'ARN messager pour le gène *atpE* de 6 souches de *M. abscessus* cultivées sans et avec TMC207 par RT-PCR en temps réel. Les gènes de référence choisis sont le gène *rpoB*, le gène *sigA* et le gène codant pour l'ARN 16S.

Pour chaque gène nous avons construit deux oligonucléotides permettant l'amplification d'environ 90 pb :

atpE_abs_S : TATCGCCGGTAACGCTCTGAT
atpE_abs_AS : TCAACCAGACCGACGGTGATG
rpoB_abs_S : ACTTCCTGACCACCGAGATCC
rpoB_abs_AS : CGACATCGGTGCGCACGCACC
sigA_abs_A : ACGAAGAAGAGTCCGAGGCG
sigA_abs_AS : GATCTGCTTGAGGTAGGCACC
RNA16S_abs_S : ATTCCCTTGTGGCCTGTGTGCA
RNA16S_abs_S : ATAGGACAAGGGTTGCGCTCG

Pour chaque région amplifiée une sonde TaqMan a été spécifiquement synthétisées avec un marquage en 5' par le reporter 6 – Carboxyfluorescein (6-FAM) et en 3' par le quencher Molecular-Groove Binding Non-fluorescence Quencher (MGBNFQ) :

atpE_abs_sonde : TGTGGCTCGTCAGCCCGAGGCT
rpoB_abs_sonde : ACACGCCGACCTCCGGCTGAT
sigA_abs_sonde : CAGGCCCGCAAGGATGCCGA
RNA16S_abs_sonde : TGCATGGCTGTCGTCAGCTC

Les réactions de RT-PCR en temps réel ont été faites grâce au kit TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems). Ce kit permet de retrotranscrire l'ARN en ADN et d'amplifier en temps réel l'ADN dans le même tube. Le mix de réaction contient 25 µl de 2X Master Mix, 1.25 µl de 40X MultiScribe™ and RNase Inhibitor Mix, 3.75 µl de l'oligo 1 (4 µM), 3.75 µl de l'oligo 2 (4 µM), 2 µ de la sonde (5 µM), 1 µg d'ARN et elle est portée à 50 µl avec eau. Les cycles de la réaction (48°C 30 minutes, 95°C 10 minutes, et 30 cycles de 95°C 15 seconds et 60°C 1 minute) ont étaient accomplis sur une machine ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystem).

2.8.3. Analyse des résultats de RT-PCR en temps réel

Les données obtenues ont été analysées avec la méthode du ΔΔCt. Le Ct (threshold cycle) est le nombre de cycle à partir duquel la courbe d'amplification de l'ADN dépasse le seuil généralement fixé au milieu de la phase exponentielle (Figure 36). En considérant deus échantillons, si le Ct du premier est plus petit par rapport au deuxième, cela signifie que la quantité d'acide nucléique cible dans le premier échantillon est plus abondante de la quantité du deuxième.

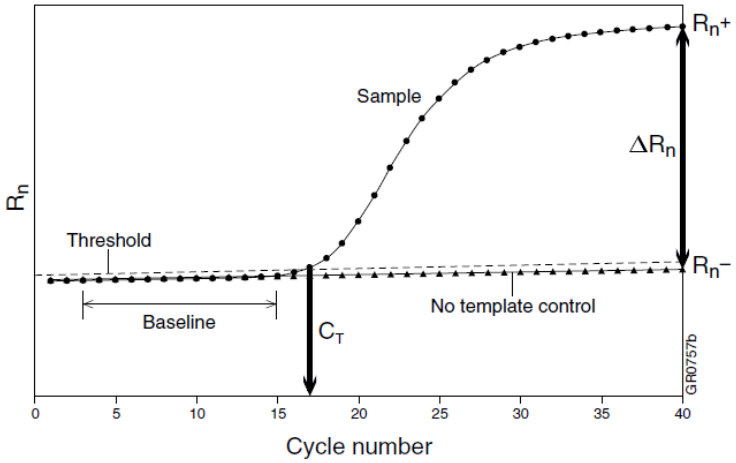


Figure 36. Courbe d'amplification obtenue avec une réaction de PCR en temps réel.

La méthode du ΔΔCt permet de déterminer si un échantillon est plus abondant par rapport à un échantillon de référence. Dans notre cas, il nous permet de déterminer si dans les souches résistantes au TMC207, la quantité d'ARNm du gène *atpE* est plus importante par rapport à la souche sauvage, en utilisant comme témoins de référence des gènes de ménage (*sigA*, *rpoB*, ARN 16S) qui normalement sont en quantité constante dans toutes les souches. Le résultat est donné en « niveau d'expression ». Les calculs sont :

- en utilisant un seul gène de référence :

$$2^{-(\Delta Ct atpE - \Delta Ct gène\ référence)}$$

où $\Delta Ct_{atpE} = Ct_{\ atpE\ souche\ résistante} - \Delta Ct_{\ atpE\ sauvage}$

$\Delta Ct_{gène\ référence} = Ct_{\ réf\ souche\ résistante} - \Delta Ct_{\ réf\ sauvage}$

- en utilisant plusieurs gènes de référence :

$$\frac{2^{-(\Delta CtatpE)}}{\sqrt[n]{2^{-(\Delta Créf1+\Delta Créf2+\ldots+\Delta Créfn)}}}$$

3. Techniques de Biologie Structurale

3.1. Construction du modèle structural de l'anneau de sous-unité c mycobactérien

Les modèles structuraux des anneaux c des ATP synthases de *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* ont été construits à partir de la séquence en acides aminés des sous-unités c des souches de référence. Ces modèles ont été construits en utilisant la structure cristallographique de l'anneau c de *S. platensis* pour laquelle le score obtenu par 3D-Jury Meta Server (Ginalski, Elofsson et al. 2003) était le plus élevé. Ce score prend en compte non seulement l'homologie de séquence primaire mais également les motifs et les structures secondaires similaires. Nous avons utilisé le programme *MODELLER* (Sali and Blundell 1993; Eswar, Webb et al. 2006), qui permet de réaliser la modélisation par homologie guidée par les contraintes stéréochimiques, pour modéliser un monomère c de chaque espèce. L'anneau complet a été reconstitué en superposant la structure obtenue sur celle de l'anneau c de *S. platensis* en utilisant SSM implémenté dans Coot (Emsley and Cowtan 2004). Les structures obtenues ont été minimisées par minimisation d'énergie à l'aide du programme CNS (Brunger, Adams et al. 1998). La stéréochimie de ces modèles a été vérifiée à l'aide du programme *PROCHECK* (Laskowski, Moss et al. 1993).

3.2. Docking du TMC207 dans les modèles

La structure du TMC207 a été construite avec le module Modeler inclus dans la suite de programme Insight II (Accelrys). Les atomes d'hydrogène ont été rajoutés et la molécule a été minimisée par minimisation d'énergie avec le programme CHARMM et les champs de force PARAM22. Les expériences de docking du TMC207 dans les modèles des sous-unités c ont été fait avec

Autodock (version 4) (Morris, Goodsell et al. 1998). La zone de liaison de la molécule a été définie par un cube de 40X40X40 $Å^3$ centré sur la région englobant le Glu61. Les simulations de docking ont été faites en utilisant l'algorithme génétique lamarckien dont les paramètres ont été fixés avec Autodock Tools (ADT) : au total 300 runs ont été faits avec une population de 250 individus, un nombre maximum d'énergie d'évaluation de 25 millions. Les meilleures solutions protéine-ligand ont été choisies en fonction de plusieurs paramètres : le regroupement des solutions fait par Autodock en fonction de l'écart quadratique moyen entre les solutions, l'évaluation de l'énergie de liaison et l'interprétation des solutions obtenues pour déterminer quelles sont les solutions les plus favorables en fonction des liaisons intramoléculaires protéine-ligand.

4. Techniques de purification des protéines membranaires

4.1. Expression et purification de la sous-unité c de *M. tuberculosis*

4.1.1. Expression hétérologue chez *E. coli* et purification de la sous-unité c de *M. tuberculosis* avec ou sans un His-Tag

Le gène *atpE* codant pour la sous-unité c de l'ATP synthase de *M. tuberculosis* a été amplifié et cloné dans les vecteurs pET29a et pET28a. Les deux constructions que nous avons faites dans le vecteur pET29 permettent la production d'une sous-unité c avec un His-Tag en C-terminal (vecteur pET29atpEBK6H – carte en annexe 1) et d'une protéine sans tag (vecteur pET29atpEBK – carte en annexe 1). Le vecteur pET28BK6H (carte en annexe 1) permet l'expression d'une sous-unité c avec un His-Tag en N-terminal. L'équipe de Timothy A. Cross du Département de Chimie et Biochimie de l'Université de l'Etat de la Floride (USA) nous a aussi fourni un quatrième plasmide, le pTBSG/Rv1305 permettant la production d'une sous-unité c avec un His-Tag en C-terminal (Qin, Hu et al. 2008).

Les quatre plasmides ont été transformés dans quatre souches de *E. coli* : la souche BL21, la souche BL21 Codon Plus et les souches C43 et C44. La

souche BL21 Codon Plus possède un plasmide portant un marqueur de résistance au chloramphénicol et les gènes codant les ARN de transfert correspondant aux codons rares AGG/AGA (arginine), AUA (isoleucine) et CUA (leucine). Les deux dernières souches sont dérivées de la souche BL21(DE3) et elles favorisent la surexpression de protéines membranaires normalement toxiques pour *E. coli* (Miroux and Walker 1996). L'induction de l'expression de la protéine a été faite avec 0.4 mM ou 1mM d'IPTG pendant 3 heures à 18°C, à 30°C ou à 37°C. Une induction à 18°C a aussi été testée pendant 16 heures.

La protéine issue des plasmides pET28atpEBK6H, pET29atpEBK6H et pTBSG/Rv1305 a été purifiée sur résine de nickel Ni-NTA-agarose (Qiagen). Après analyse de la purification sur gel SDS-PAGE 14%, les protéines récupérées ont été transférées sur membrane de PVDF et analysées par Western Blot avec des anticorps anti-His-Tag.

4.1.2. Expression *in vitro* de la sous-unité c de *M. tuberculosis*

Avec le kit Rapid Translation System RTS 100 *E. coli* HY (Roche) nous avons essayé une synthèse *in vitro* de la sous-unité c de *M. tuberculosis.* Le système est basé sur l'utilisation d'un lysat de *E. coli* contenant toutes les enzymes nécessaires à la transcription et la traduction. Ce type de système est très utile pour produire des protéines toxiques pour lesquelles l'expression hétérologue chez *E. coli* ne fonctionne pas. La transcription et la traduction du gène d'intérêt se fait simultanément dans 50 µl de réaction dans lequel il est possible d'ajouter du détergent. Cette réaction se fait durant 1 à 6 heures.

La réaction a été faite en suivant le protocole du kit, avec différentes constructions : (i) la sous-unité c de *M. tuberculosis* clonée dans le vecteur pET29a avec un His-Tag (pET29atpEsme6H), (ii) la sous-unité c clonée dans le même vecteur sans tag (pET29atpEsme), et (iii) la sous-unité c clonée en protéine de fusion avec la Maltose Binding Protein (pMALc2 - paragraphe 4.1.3 du matériel et méthodes page 94). Afin de resolubiliser la protéine, nous avons utilisé le SDS ou le Triton X100 à une concentration finale de 2% comme cela a été décrit pour la purification de la sous-unité b de l'ATP synthase de *E. coli* faite avec ce kit (Lian, Ma et al. 2009).

4.1.3. Expression hétérologue chez *E. coli* et purification de la sous-unité c de *M. tuberculosis* sous forme d'une protéine de fusion avec la Maltose Binding Protein

La Maltose Binding Protein (MBP) de *E. coli* a été largement utilisée pour produire des protéines de fusion. La MBP peut en effet être facilement exprimée dans le cytoplasme de *E. coli* et purifiée grâce à son affinité naturelle pour une résine d'amylose. L'expression d'une protéine membranaire en fusion avec la MBP peut protéger la protéine de la dégradation et de l'agrégation, favoriser sa solubilité, et faciliter sa purification (Kapust and Waugh 1999).

Deux constructions plasmidiques permettant l'expression de la sous-unité c de *M. tuberculosis* en fusion avec la MBP ont été testées (Figure 37). Les constructions ont été faites par Huajun Qin du laboratoire de Timothy A. Cross du Département de Chimie et Biochimie de l'Université de l'Etat de la Floride (USA) (Korepanova, Moore et al. 2007; Qin, Hu et al. 2008). Les deux constructions, pMALc2 et pTBMAL/Rv1305, ont en commun un gène de résistance à l'ampicilline, le gène codant pour la MBP de *E. coli*, un His-Tag et un site de coupure pour une protéase. Le gène *atpE* de *M. tuberculosis* (*rv1305)* a été cloné juste après ce site de coupure. Les deux protéines recombinantes obtenues, MBP-His-suc produite par pMALc2 et His-MBP-suc produite par pTBMAL/Rv1305, diffèrent par deux points :

- le site de coupure protéasique : thrombine pour MBP-His-suc et TEV pour His-MBP-suc ;
- la localisation des 8 histidines (His-Tag) : C-terminal de la MBP pour MBP-His-suc et N-terminal de la MBP pour His-MBP-suc.

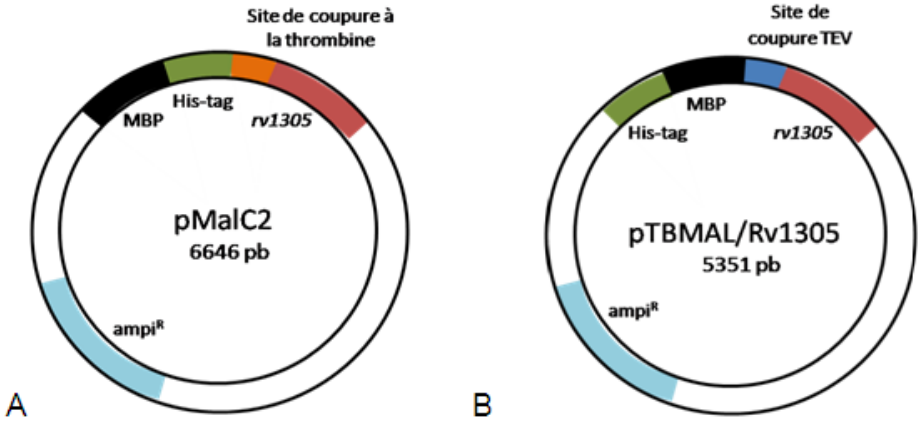


Figure 37. Carte des plasmides (A) pMALc2 et (B) pTBMal/Rv1305.

4.1.3.1. Production de la protéine

Les protéines de fusion MBP-His-su*c* et His-MBP-su*c* sont surexprimées dans des cellules *E. coli* BL21 Codon Plus : après transformation avec les vecteurs pMALc2 et pTBMal/Rv1305, les cellules ont été cultivées dans 4 ml de milieu LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline à 37°C 16 heures. Ces précultures permettent d'inoculer 1 litre de milieu LB + ampicilline. A une DO_{600nm} de 0.9, les cultures sont induites avec 1 mM final d'IPTG pendant 3 heures. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 15 minutes à 3000 g et les culots conservés à -20°C.

4.1.3.2. Purification de la protéine

Pour la purification de la protéine MBP-His-su*c*, les culots bactériens sont resuspendus dans 10 ml de tampon Tris-HCl 20 mM pH 8 et NaCl 200 mM, et cassés par sonication (3 fois 2 minutes) ou par Presse de French (4 passages à 1100 psi/g). Une première centrifugation est faite pendant 15 minutes à 6000 g pour éliminer les débris membranaires (culot C1 du schéma en annexe 2) et pour avoir un surnageant (S1) qui contient les protéines solubles et les vésicules membranaires. Lorsque les cellules sont cassées grâce à la Presse de French, une deuxième centrifugation est faite pendant 30 minutes à 145000 g, afin de précipiter les vésicules membranaires et donc les protéines membranaire (C2). Ce culot membranaire (C2) ainsi que le culot contenant les débris cellulaires (C1) de la première centrifugation sont resuspendus dans un tampon TrisHCl 20 mM pH8, NaCl 200 mM, DDM 2% pendant 2 h à 4°C sous agitation. La solution est ensuite centrifugée 1 h à 13000 g afin de séparer ce qui n'a pas été solubilisé par le détergent et obtenir les protéines membranaires solubilisées (S3 et S4).

La protéine de fusion a été purifiée grâce à une résine d'amylose (BioLabs) en présence de détergent. Le surnageant obtenu après centrifugation (S2, S3 et S4) est mis en contact pendant 16 heures à 4°C avec 1 ml de billes d'amylose/agarose pré-équilibré. Deux lavages d'une heure chacun sont faits à l'aide d'un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM contenant du détergent. La protéine est éluée avec un tampon TrisHCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM, 0.36% D-maltose contenant du détergent. Une première élution est faite pendant 1 heure et une deuxième pendant 16 heures. Dans cette approche, nous avons testé plusieurs détergents :

- DDM à une concentration finale de 0.02% ou 0.04%
- TriDM à une concentration finale de 0.005%
- N-Lauroylsarcosine à une concentration finale de 0.3%

La protéine de fusion a aussi été purifiée grâce au His-Tag sur une résine de nickel Ni-NTA agarose (Qiagen) avec le détergent DDM à une concentration finale de 0.02%. Comme pour la purification sur résine d'amylose, les surnageants obtenus après les centrifugations (S2, S3 et S4) sont mis en contact pendant 16 heures à 4°C avec 1 ml de la résine de nickel pré-équilibrée avec un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM, imidazole 5 mM. Deux lavages d'une heure chacun sont faits avec le tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM, imidazole 20 mM, DDM 0.1%. Une première élution est faite pendant 1 heure et une deuxième pendant 16 heures avec le tampon TrisHCl 20 mM pH 8, NaCl 200 mM, imidazole 300 mM, DDM 0.02%.

Après purification par affinité sur résine d'amylose, la protéine ainsi récupérée est concentrée (concentrateur Amicon Ultra 3k 15ml, Millipore) avant d'être injectée sur une colonne de séparation de gel filtration Superdex^{TM} 200 HR 10/30 (GE Healthcare) équilibrée avec un tampon identique à celui de la protéine. Ceci permet la séparation de la protéine MBP-His-su*c* de la MBP endogène de *E. coli* qui a aussi une affinité pour l'amylose.

Après analyse sur gel SDS-PAGE 12%, les fractions contenant la protéine MBP-His-su*c*, d'une masse moléculaire attendue d'environ 51 kDa, sont regroupées, concentrées et dosées.

La protéine de fusion His-MBP-su*c* a été purifiée sur résine de nickel ou sur résine d'amylose selon le protocole de la protéine MBP-His-su*c*. Pendant les étapes de purification le détergent DDM a été utilisé à une concentration finale de 0.02%.

4.1.3.3. Digestion de la protéine de fusion MBP-His-su*c* avec la thrombine

La protéine de fusion MBP-His-su*c* a été digérée avec la thrombine afin de séparer la MBP de la protéine d'intérêt. Les conditions optimales de digestion sont : 100 µl de thrombine (VWR internationals, 1 U/µl), 30 µl de protéine

concentrée (environ 10 mg/ml), et 70 µl tampon (Tris HCl 20 mM pH8, NaCl 200 mM, detérgent). Les détergents testés ont été :

- DDM à la concentration finale de 0.02% ou 0.04%
- N-Lauroylsarcosine à la concentration finale de 0.4%
- Triton X100 à la concentration finale de 0.1%

La réaction est incubée 4h à 4°C. Les digestions ont été déposées sur gel SDS-PAGE 16%.

4.1.3.4. Digestion de la protéine de fusion His-MBP-suc avec la protéase TEV

La protéine de fusion His-MBP-suc est digérée à l'aide de la protéase TEV. La réaction de digestion optimale est faite avec un rapport TEV/protéine de 1/10 et incubée pendant 16 heures à 30°C. Nous avons testé la digestion avec trois détergents différents :

- DDM à la concentration finale de 0.02%
- TriDM à la concentration finale de 0.005%
- N-Lauroylsarcosine à la concentration finale de 0.4%

Les digestions ont été déposées sur gel SDS-PAGE 16%.

4.2. Expression et purification de l'ATP synthase de *M. smegmatis*

4.2.1. Expression homologue de la sous-unité c de *M. smegmatis* chez *M. smegmatis* sans tag

Les bactéries contenant le vecteur pLYGatpEsme ont été cultivées dans 4 litres de milieu BHI-Tween additionné de 100 µg/ml de zéocine.

Différents protocoles ont été utilisés afin de purifier la protéine. Nous avons dans un premier temps utilisé le protocole de purification de l'anneau c de *I. tartaricus* (Neumann, Matthey et al. 1998). En bref, les bactéries ont été resuspendues dans 15 ml de tampon 50 mM potassium phosphate pH 8, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM diisopropyl fluorophosphate, 0.1 mg de DNase I et soniquées 3 fois 3 minutes. Une première centrifugation à 7700 g permet d'enlever les débris cellulaires (culot C1 de l'annexe 2) et une deuxième de

145000 g pendant 30 minutes permet de précipiter les vésicules membranaires (C2). Ces dernières sont ensuite resuspendues dans 10 ml de tampon 50 mM MOPS (morpholinepropanesulfonic acid)-KOH buffer pH 7, Triton X100 1% pendant 2 h à 4°C afin de solubiliser les protéines membranaires. L'ATP synthase est récupérée dans un tampon 5 mM potassium phosphate pH 7, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM diisopropyl fluorophosphate, et Triton X100 0.05%, par précipitations différentielles au PEG 6000. Dans un deuxième temps nous avons essayé de modifier le protocole et d'introduire une précipitation au sulfate d'ammonium, comme Cook et al. (Cook, Keis et al. 2003), et de changer le Triton X100 par le DDM (avec une concentration de 2% pour la solubilisation et 0.05% pour la purification finale).

4.2.2. Expression homologue de la sous-unité c de *M. smegmatis* chez *M. smegmatis* avec un His-Tag

Le plasmide pLYGatpEsme6H a été transformé par électroporation dans une souche sauvage de *M. smegmatis*. Des cultures de la souche transformée ont été cultivées à 30°C ou à 37°C pendant 16 heures. Nous avons fait différents tests d'expression de la sous-unité c de *M. smegmatis* à partir de volumes de culture variant entre 4 ml et 10 litres.

Le culot bactérien a été resuspendu dans un tampon TrisHCl 20 mM pH8, NaCl 300 mM, $MgCl_2$ 10 mM et soniqué de 2 à 6 fois (selon le volume de culture de départ) pendant 2 minutes. Une première centrifugation est faite à 10000 g pendant 15 minutes afin de précipiter les débris membranaires (culot C1 annexe 2). Le culot C1 a été repris dans un tampon TrisHCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Imidazole 20 mM, contenant du détergent pour la solubilisation. Le surnageant (S1) est centrifugé à 145000 g pendant 30 minutes afin de récupérer les vésicules membranaires (C2), puis ces dernières sont solubilisées dans un tampon TrisHCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM, Imidazole 5 mM, contenant du détergent pour la solubilisation des protéines. Avec une centrifugation de 200000 g pendant 1 heure, les protéines non-solubilisées dans le détergent sont récupérées (C3 et C4) et puis reprises en urée 6 M. Plusieurs détergents ont été testés pour la solubilisation : Triton X100 5%, DDM 2%, Triton X114 2.8%, Zwittergent 3-12 2%, N-Lauroylsarcosine 2%, Tween 20 2%, et Tween 80 2%.

La purification a été faite sur résine de nickel Ni-NTA agarose. Les surnageants obtenus après centrifugation contenant les protéines membranaires solubilisées (S3 et S4) sont mis en contact pendant 16 heures à 4°C avec 1 ml de résine de nickel pré-équilibré (Qiagen). Deux lavages d'une heure chacun sont faits à l'aide d'un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Imidazole 20 mM contenant du détergent. La protéine est éluée avec un tampon TrisHCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Imidazole 200 mM contenant du détergent. Une première élution est faite pendant 1 heure et une deuxième pendant 16 heures. Pour la purification, plusieurs détergents ont été testés :

- DDM à une concentration finale de 0.02%
- Triton X100 à une concentration finale de 0.2%
- Zwittergent 3-12 à une concentration finale de 0.5%

Toutes les fractions sont analysées sur gel SDS-PAGE 12% ou 14%, ou sur gel à gradient 10%-20% en Tricine qui sont des gels plus adaptés pour la migration de protéines de petite taille. La coloration est faite au Bleu de Coomassie ou avec un kit de coloration au zinc (Zinc Stain kit - Bio-Rad).

4.2.3. Expression homologue de la sous-unité β de *M. smegmatis* chez *M. smegmatis*

Les bactéries transformées avec le plasmide pLYGatpDsme6H sont cultivées dans 6 litres de BHI+Tween80 contenant 100 µl de zéocine pendant 16 heures à 37°C. Cela permet de récupérer 20-25 g de bactéries qui ont été repris dans 30 ml de tampon Tris HCl pH8 20 mM, NaCl 300 mM, $MgCl_2$ 10 mM. Le cassage des bactéries se fait soit par sonication, soit par Presse de French. Dans le premier cas les bactéries sont soniquées 3 fois 2 minutes et centrifugées à 10000 g 15 minutes pour séparer les débris membranaires (C1 du schéma de l'annexe 2) des protéines solubles (S1). Le C1 est resuspendu dans 20 ml de tampon Tris HCl pH8 20 mM, NaCl 300 mM, $MgCl_2$ 10 mM, Imidazole 5 mM, Triton X100 1%, 2% ou 5% et mis à agiter à 4°C pendant 16 heures. Dans le cas de l'utilisation de la Presse de French, les bactéries sont reprises dans 40 ml de tampon Tris HCl pH8 20 mM, NaCl 300 mM, $MgCl_2$ 10 mM, 5 U de DNAse et cassées avec deux passages à 1 100 psi/g. Une centrifugation à 4300 g pendant 15 minutes est faite afin de précipiter les débris membranaires (C1). Le

surnageant (S1) contenant les protéines solubles et les vésicules membranaires est centrifugé 145000 g pendant 30 minutes afin de séparer les vésicules membranaires (C2) des protéines solubles (S2). Le culot C1 est solubilisé dans un tampon Tris HCl pH8 20 mM, NaCl 300 mM, $MgCl_2$ 10 mM, imidazole 5 mM, Triton X100 5% ou TriDM 0.4%, et le culot C2 dans un tampon Tris HCl pH8 20 mM, NaCl 300 mM, $MgCl_2$ 10 mM, imidazole 5 mM, DDM 2% ou TriDM 0.4% pendant 16 heures à 4°C sous agitation. Après solubilisation, les deux culots membranaires ont été centrifugés 1 heure à 13000 g pour précipiter ce qui n'est pas soluble et les surnageants contenant les protéines membranaires (S3 et S4) sont chargés sur une colonne His-TRAP (GE Healthcare). L'élution se fait avec un gradient d'imidazole dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 300 mM, $MgCl_2$ 10 mM contenant du Triton X100 0.1% ou du DDM 0.02%.

Les fractions qui contiennent l'ATP synthase sont concentrées (concentrateur Amicon Ultra 3k, Millipore) avant d'être injectées sur une colonne de séparation de gel filtration Superdex^{TM} 200 HR 10/30 (GE Healthcare) équilibrée avec un tampon identique à celui de la protéine.

Toutes les fractions de la purification ont été déposées sur gel SDS-PAGE 12%. La fraction correspondant à l'ATP synthase a été déposée sur un gel BN-PAGE 4-16% (Serva).

4.3. Précipitation des protéines à l'acide trichloroacétique (TCA)

Le TCA permet de déstabiliser les interactions hydrophobes des protéines et il a la capacité de dissocier l'anneau c de *I. tartaricus* (Neumann, Matthey et al. 1998) et de *C. paradoxum* (Meier, Ferguson et al. 2006) en monomères de sous-unités c. Les protéines ainsi précipitées peuvent être reprises dans un volume plus petit ce qui permet également de les concentrer avant de le déposer sur gel SDS-PAGE.

100 µl de la solution protéique sont mélangés avec 100 µl de TCA 10% et mis à 4°C pendant 20 minutes avant d'être centrifugé 15 minutes à 10000 g. Le culot protéique est lavé avec de l'éthanol 100%, et après évaporation totale de l'éthanol il est resuspendu dans un tampon pour être déposé sur gel.

4.4. Western Blot

Toutes les fractions des tests de purification ont été déposées sur gel SDS-PAGE. Après migration, le gel est équilibré avec le tampon de transfert Tris 25 mM, glycine 192 M, méthanol 20%, SDS 0.1% et transféré sur une membrane de PVDF pré-équilibrée dans le même tampon à l'aide du Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad). Le transfert se fait pendant 12 minutes à 10 V. La détection des protéines portant un His-Tag a été faite avec le kit His-Tag Monoclonal Antibody (Novagen) via une réaction de chemiluminescence.

1.5. Blue Native (BN) - PAGE

Le Blue Native (BN) – PAGE est une électrophorèse en condition native (Schagger and von Jagow 1991). La présence du bleu de Coomassie G250 (qui diffère du bleu de Coomassie R250 par la présence de deux groupes méthyles supplémentaires) dans le tampon de migration de la cathode permet de conférer une charge négative aux protéines, sans les dénaturer. Il est ainsi possible de séparer les protéines essentiellement selon leur masse moléculaire (même si leur structure native ou leur charge intrinsèque peuvent influencer la migration) et en condition native en gardant les complexes multiprotéiques intacts. Le BN-PAGE est une technique bien adaptée aux protéines membranaires car le bleu de Coomassie G250 est très hydrophobe, ce qui lui permet de se fixer à tous les complexes membranaires empêchant les phénomènes d'agrégation, même en absence d'autres détergents.

Nous avons utilisé des gels BN-PAGE 4-16% et le kit SERVAGel^{TM}N Native Gel Starter Kit (SERVA). Le tampon de migration de la cathode est composé de 500 mM Tricine et 150 mM BisTris, celui de l'anode de 500 mM BisTris pH 7. Les conditions de migration et de fixation des gels sont décrites dans le protocole du kit.

5. Techniques de Biophysique

5.1. La cristallisation

5.1.2. Principe de la cristallisation

La cristallisation est une transition de phase : la macromolécule biologique cristallisée passe d'un état désordonné en solution à un état solide ordonné. Le comportement d'une macromolécule biologique en fonction des variations de son environnement peut être décrit sous la forme d'un diagramme de phases (Figure 38A). En fonction des cinétiques et du taux de sur-saturation, la zone de sursaturation peut être délimitée en 3 zones :

- **zone de précipitation** : zone de précipité amorphe (favorisé par une cinétique rapide)
- **zone de nucléation** : zone où peuvent apparaître puis croître les germes cristallins (le taux de nucléation dépend du taux de sur-saturation)
- **zone métastable** : solution sur-saturée qui peut rester sans cristalliser à moins qu'on y ajoute un cristal (ensemencement)

Le passage de la zone sous-saturée à la zone sur-saturée est réalisé en faisant varier un ou plusieurs paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH, la concentration en agent cristallisant (sel, polymère, solvant organique). La stratégie couramment employée pour déterminer les conditions optimales de cristallisation des protéines est de procéder par essais et erreurs. Pour cela il faut tester un grand nombre de conditions de cristallisation. La méthode de cristallisation la plus employée est celle de la diffusion de vapeur (Figure 38B), l'eau s'évapore de la goutte jusqu'à ce qu'il y ait la même concentration en agent précipitant dans la goutte et dans le réservoir, ce qui va entraîner la cristallisation de la macromolécule biologique.

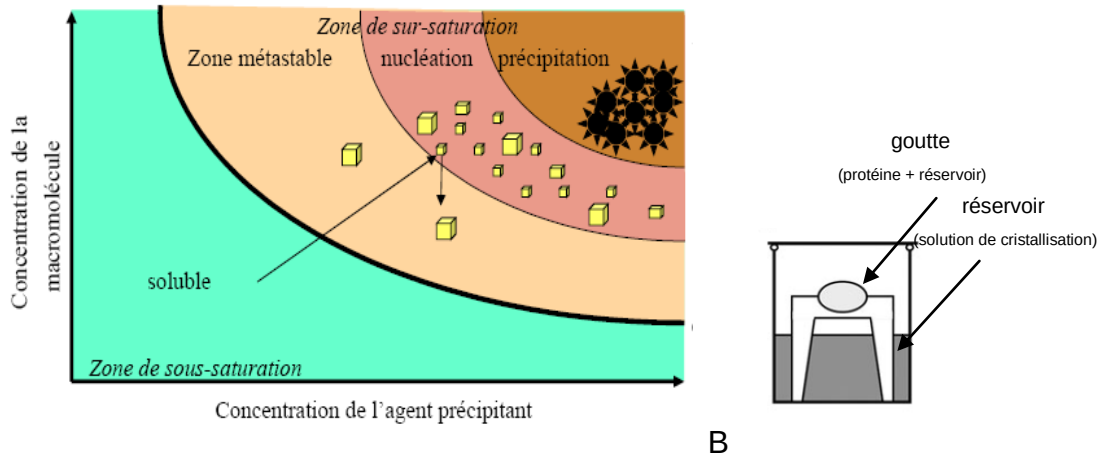


Figure 38. (A) Diagramme de phase bidimensionnel d'une macromolécule en fonction de sa propre concentration et de la concentration en agent cristallisant. (B) La méthode de cristallisation par diffusion de vapeur en goutte assise (Sauter and Giegé 2001).

Les cristaux obtenus sont ensuite récupérés à l'aide d'une boucle de dimension variable selon la taille du cristal, cryoprotégés et conservés dans l'azote liquide. Les données de diffraction sont enregistrées dans un centre de rayonnement synchrotron (faisceau de rayons X).

5.1.2. Test de cristallisation de la protéine de fusion MBP+His-suc

Les tests de cristallisation de la protéine de fusion MBP-His-suc ont été faits par la méthode de diffusion de vapeur. Avec les kits Crystal Screen I et II (Hampon Research) nous avons fait des gouttes assises (Figure 38B) dans des boîtes de 24 puits avec un volume de réservoir de 500 µl et de gouttes de 1+1 µl respectivement de protéine et de réservoir. Pour la condition I du Crystal Screen I, nous avons fait varier les conditions de pH et de concentration de 2-Methyl-2,4-pentanediol afin de reproduire les cristaux obtenus. Les cristaux obtenus ont été analysés sur les lignes de lumière de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble.

5.1.3. Test de cristallisation de l'ATP synthase de *M. smegmatis*

La fraction correspondante à l'ATP synthase de *M. smegmatis* purifiée a été concentrée, dosée et utilisée pour des tests de cristallisation avec les kits Crystal Screen I et II (Hampon Research). Nous avons fait des gouttes assises (Figure 41B) dans des boîtes de 24 puits avec un volume de réservoir de 500 µl et

de gouttes de 1+1 µl respectivement de protéine et de réservoir. Les cristaux obtenus ont été analysée sur les lignes de lumière de l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble.

5.2. La spectrométrie de masse

5.2.1. Principe de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse comporte une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs qui séparent les ions produits selon leur rapport m/z, d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/*z*, où m représente la masse et z la valence (ou m/q, q représentant la charge) des ions détectés selon l'axe des abscisses, et l'abondance relative de ces ions selon l'axe de ordonnées.

Pour l'analyse de nos échantillons nous avons utilisé les spectromètres de masse MALDI-TOF et nanoLC-ESI-MS-MS disponibles à la plateforme protéomique P3S de la Pitié Salpêtrière.

5.2.2. MALDI-TOF

Un instrument de type MALDI-TOF est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry) (Figure 39A). L'échantillon est mélangé à une matrice en solution. Une gouttelette de ce mélange est déposée sur la surface d'une plaque métallique appelée cible (Figure 39B). Par évaporation du solvant, le dépôt devient une solution cristalline. Ce dépôt est ensuite bombardé par un faisceau laser. La matrice absorbe à la longueur d'onde du laser à azote qui est un laser pulsé. Ceci provoque le passage à l'état gazeux des cristaux échantillon-matrice et conduit à la formation des ions qui volent dans le tube de vol. La masse d'un ion est mesurée en fonction du temps que met cet ion pour arriver jusqu'au détecteur

(les ions petits volent plus rapidement que les gros). Les temps de vol est alors converti en masse sur charge (m/z).

A 

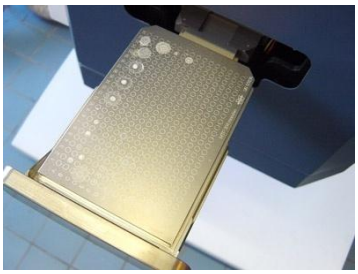
B 

Figure 39. (A) Un spectromètre de masse MALDI-TOF, (B) la cible sur laquelle est déposé le mélange échantillon-matrice.

5.2.3. NanoLC-ESI-MS/MS

Le système LC-ESI-MS/MS (Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry – Figure 40) permet la séparation des peptides par chromatographie avant leur analyse MS/MS. Les peptides arrivent séquentiellement dans la source (electrospray) du spectromètre de masse et vont être ionisés. Dans un deuxième temps, les peptides vont être analysés dans le spectromètre de masse. Celui-ci permet de mesurer la masse des peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines (MS simple) et de fragmenter ces mêmes peptides (spectre MS-MS) pour accéder à la structure en acides aminés de ces dernies.





Figure 40. Un spectromètre de masse LC-ESI-MS/MS

5.2.4. Préparation de l'échantillon pour la spectrométrie de masse

Les bandes visibles sur gel SDS-PAGE des tests de purification de la sous-unité c de l'ATP synthase mycobactérienne ont été analysées en spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines correspondantes.

Le protocole utilisé classiquement a été adapté pour la manipulation des protéines hydrophobes (Kang, Fuchs et al. 2009). Les bandes protéiques visibles sur gel SDS-PAGE sont excisées du gel et déposées dans un tube Eppendorf LoBind. Les spots sont décolorés du Bleu de Coomassie avec 3 lavages dans une solution d'ammonium bicarbonate 25 mM, éthanol 50% et séchés ensuite dans l'acétonitrile. Des réactions de réduction et alkylation ont été faites avec un tampon de bicarbonate d'ammonium 100 mM, DDT 10 mM et bicarbonate d'ammonium 100 mM, iodoacétamide 55 mM respectivement. Les spots sont digérés à la trypsine à 37°C pendant 16 heures. Une solution de 0.5% acide formique et 20% acétonitrile a été ensuite ajoutée aux spots. Les tubes sont mis dans un bain à ultrasons 3 fois pendant 15 minutes, afin de libérer les peptides de la digestion du gel, et toutes les fractions sont récupérées et poolées. Le volume des échantillons est ramené à 10 µl par évaporation de la solution dans un SpeedVac pendant 1 heure. Pour l'analyse au MALDI-TOF, une purification supplémentaire est nécessaire avec des ZipTip micro c18 Pipette Tips (Millipore).

5.2.5. Analyse des résultats obtenus en spectrométrie de masse

Après le passage de chaque échantillon au spectromètre de masse, un spectre de la masse sur l'état de charge en fonction du temps (spectre m/z) est obtenu. Ce spectre est comparé avec une base de données qui contient les spectres de digestion hypothétiques de toutes les protéines connues (Mascot Search). Nous avons utilisé de préférence la base de donnés NCBInr parce qu'elle est plus adaptée pour les protéines mycobactériennes.

5.3. Microscopie électronique

5.3.1. Principe de la microscopie électronique

La microscopie électronique en transmission (TEM) est une technique de microscopie où un faisceau d'électron traverse un échantillon très mince (Figure 41). Elle consiste à placer un échantillon suffisamment mince sous un faisceau

d'électrons, et à utiliser un système de lentilles magnétiques pour projeter l'image de l'échantillon sur un écran phosphorescent qui transforme l'image électronique en image optique (image directe). Plusieurs méthodes d'observation des échantillons biologiques permettent d'obtenir des informations de surface ou de volume, à des résolutions de l'ordre de la dizaine d'angströms.



Figure 41. Photo d'un microscope électronique en transmission.

5.3.2. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique et analyses des images

Les expériences de microscopie électronique ont été réalisées en collaboration avec Catherine Vénien-Bryan de l'IMPMC (UPMC). La fraction de purification contenant l'ATP synthase de *M. smegmatis* a été analysée par microscopie électronique en coloration négative avec un microscope Jeol 2100.

La solution protéique contenant l'ATP synthase de *M. smegmatis* a été diluée à 30 µg/ml ou 15 µg/ml et 1 µl de la solution a été déposé sur une grille métallique préalablement recouverte d'un film de carbone fin. L'échantillon est séché à l'air libre. Une solution contenant un agent contrastant, l'acétate d'uranyle 2%, a ensuite été ajoutée sur la grille au-dessus de l'échantillon et après quelques secondes l'excès de colorant est absorbé à l'aide d'un papier filtre. L'échantillon est ensuite inséré dans le microscope au niveau du porte-objet et observé en mode image. L'acétate d'uranyl va se fixer préférentiellement au bord des

particules absorbées, et sa forte masse atomique dévie les électrons. Ainsi l'échantillon biologique apparaît plus clair que ce qui l'entoure.

105 images ont été enregistrées à un grossissement de 40000x, et 247 particules isolées ont été analysées avec Xmipp (X-Window-based Microscopy Image Processing Package, suite de programmes pour traitement d'images, adapté aux particules isolées en microscopie électronique) (Marabini, Masegosa et al. 1996; Sorzano, Marabini et al. 2004; Scheres, Nunez-Ramirez et al. 2008).

ETUDE DE LA RESISTANCE AU TMC207

1. Etude des mutants résistants au TMC207

Nous avons sélectionné *in vitro* des mutants résistants au TMC207 à partir de plusieurs espèces mycobactériennes :

- la souche de référence de *M. tuberculosis* H37Rv ;
- trois souches cliniques de *M. tuberculosis* : P, Di et V ;
- une souche clinique de *M. abscessus* : V ;
- une souche clinique de *M. fortuitum* : B ;
- la souche de référence de *M. smegmatis* mc^2155.

Les colonies résistantes ont été sélectionnées sur milieu agar contenant des concentrations croissantes de TMC207. La présence de mutations dans la sous-unité c de l'ATP synthase a été vérifiée en amplifiant et séquençant le gène *atpE* ainsi que 78 pb et 121 pb en amont et en aval du gène. Les résultats sont présentés dans le Tableau 8.

Le premier résultat notable concerne le taux de mutation. Quelle que soit l'espèce et la souche, les fréquences de mutation varient entre 10^{-8} et 5.10^{-8} (Tableau 8) et sont comparables aux fréquences de mutation d'autres antibiotiques utilisés dans le traitement de la TB, comme la rifampicine ($3.1.10^{-8}$) (Johnson, Streicher et al. 2006).

Le deuxième résultat notable concerne l'absence de mutation dans certains clones résistants au TMC207. En effet, sur les 48 colonies de *M. tuberculosis* résistantes au TMC207, seulement 19, soit 39% des colonies, ont une mutation dans le gène *atpE*. Ce pourcentage est variable en fonction de la souche : pour la souche de référence H37Rv, seulement 16% des colonies sont mutées, alors que pour les souches cliniques P, D et LQ respectivement 71%, 50% et 83% des colonies sont mutées. En ce qui concerne les mycobactéries atypiques, 47% des colonies résistantes au TMC207 sont mutées pour *M. abscessus* V et 100% pour *M. fortuitum* B et *M. smegmatis* (Tableau 8).

L'étude des colonies mutées a permis l'identification de plusieurs substitutions différentes. La sélection de clones résistants à partir de H37Rv a permis d'obtenir 4 clones mutés dans la sous-unité c, parmi les 25 sélectionnés, portant tous la substitution A63P. Pour les souches cliniques de *M. tuberculosis* P, Di et V nous observons une diversité de mutations plus importante. En effet 5

mutations différentes ont été identifiées : D28G, L59V, E61D, A63P et I66M. Pour les mycobactéries atypiques, seule la mutation D32A a été identifiée pour les 9 colonies mutantes de *M. fortuitum*, et la mutation I66M pour les 8 mutants de *M. smegmatis*. Enfin, deux mutations différentes sont présentes dans les colonies résistantes de *M. abscessus,* D32A et A63P (Tableau 8).

Pour aller plus loin dans la caractérisation de ces clones, nous avons mesuré le niveau de résistance pour chaque souche mutante en déterminant la CMI du TMC207 (Tableau 8). Les colonies mutantes issues de la même espèce et portant la même mutation dans le gène *atpE* ont une CMI identique pour le TMC207, indépendamment de la concentration à laquelle elles ont été sélectionnées et de la souche utilisée pour la sélection. Pour *M. tuberculosis,* la CMI la plus élevée a été observée pour les clones portant la mutation A63P avec une CMI de 4 µg/ml, ce qui correspond à une augmentation de 133 fois la CMI de la souche sauvage. Pour les mutants de *M. tuberculosis* portant les mutations E61D, I66M et D28G, une CMI comprise entre 0.5 µg/ml et 1 µg/ml a été mesurée, ce qui représente 16 et 33 fois la CMI de la souche sauvage. Enfin, pour les souches de *M. tuberculosis,* la CMI la plus basse (0.25 µg/ml) a été identifiée pour le clone muté à la position 59 (L59V). Pour les mycobactéries atypiques, les CMIs pour le TMC207 varient de 4 µg/ml à 16 µg/ml. Chez *M. fortuitum,* les clones résistants portant la mutation D28A ont une CMI 400 fois plus élevée que la CMI de la souche sauvage. La même mutation identifiée chez *M. abscessus* ne confère une augmentation que de 32 fois la CMI par rapport au sauvage. Les clones résistants de *M. abscessus* portant la mutation A63P et les clones de *M. smegmatis* portant la mutation I66M ont des CMIs qui sont respectivement 64 et 133 fois plus élevée que la CMI des souches sauvages (Tableau 8).

Souches	Fréquence de mutation	Nombre de mutants/ nombre de colonies testées	Mutations identifiées dans la sous-unité c (nombre de mutants)	CMI (mg/L)		
				mutant	sauvage	incrément de la CMI
M. tuberculosis H37Rv	10^{-8}	4/25	**A63P** (4)	4	0.03	133
P	5.10^{-8}	5/7	**D28G** (4)	0.5		16
			E61D (1)	Nd		
D	10^{-8}	5/10	**A63P** (2)	4		133
			L59V (1)	0.25		8
			E61D (2)	0.5		16
LQ	10^{-8}	5/6	**D28G** (1)	0.5		16
			E61D (2)	1		33
			A63P (1)	4		133
			I66M (1)	1		33
M. fortuitum B	$1.5.10^{-8}$	9/9	**D28A** (9)	4	0.01	400
M. abscessus V	$1.5.10^{-8}$	8/17	**A63P** (1)	16	0.25	64
			D28A (7)	8		32
M. smegmatis mc^2155	nd	8/8	**I66M** (8)	16	0.12	133

Tableau 8. Mutants sélectionnés *in vitro* résistants au TMC207.

Nous nous sommes ensuite plus particulièrement intéressés aux clones de *M. tuberculosis* résistants au TMC207 sans mutation dans le gène *atpE*. La première étape a été de vérifier par Southern Blot qu'une seule copie du gène *atpE* est présente dans le génome de *M. tuberculosis.* Le génome a été digéré avec les enzymes de restriction *Msc*I et *Nco*I, utilisées séparément. Ces enzymes coupent assez fréquemment dans le génome mais elles n'ont pas de sites de restriction dans la séquence du gène *atpE.* Les fragments obtenus ont été séparés grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose 1% et l'hybridation a été faite en utilisant comme sonde le gène *atpE* marqué de *M. tuberculosis*. Nous avons pu observer que la sonde s'hybride sur un seul fragment du génome après digestion par chaque enzyme. La taille des fragments reconnus par la sonde est d'environ 1200 pb et 3300 pb, respectivement pour *Msc*I et *Nco*I (Figure 42), ce qui correspond à la taille attendue de 1218 pb et 3368 pb. Ce résultat indique qu'une seule copie du gène *atpE* est présente dans le génome de *M. tuberculosis*.

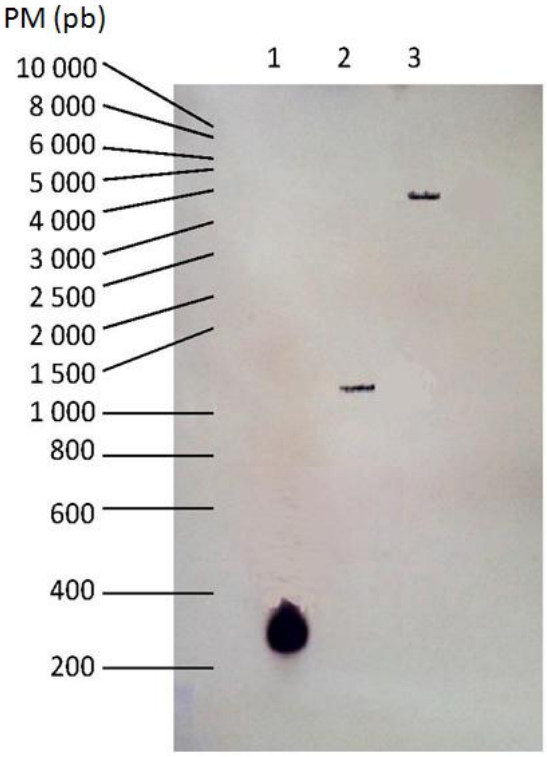


Figure 42. Southern Blot effectué avec une sonde s'hybridant sur le gène *atpE* des digestions du génome de *M. tuberculosis* avec *Msc*I et *Nco*I. Puits 1 : témoin positif. Puits 2 : digestion avec *Msc*I. Puits 3 : digestion avec *Nco*I. Sur la gauche le marqueur de poids moléculaire en pb.

La deuxième étape a consisté à vérifier l'absence ou la présence de mutations dans la sous-unité a de l'ATP synthase des clones résistants de *M.*

tuberculosis sans mutation dans le gène *atpE*. En effet, une des hypothèses sur le mécanisme de résistance au TMC207 est que la drogue mimerait l'interaction de la sous-unité a avec la sous-unité c en se liant à l'interface entre les deux sous-unités, bloquant ainsi le transfert des protons (de Jonge, Koymans et al. 2007). L'amplification et le séquençage du gène *atpB* (codant pour la sous-unité a de l'ATP synthase de *M. tuberculosis*) a permis de voir qu'il n'y a aucune mutation dans les colonies.

La troisième étape a porté sur la vérification de l'absence ou la présence de mutations dans toutes les autres sous-unités de l'ATP synthase. Pour cela l'opéron *atp* entier d'environ 8 000 pb a été amplifié et séquencé pour trois clones de *M. tuberculosis* : la souche sauvage de référence H37Rv, une souche résistante à la drogue avec une mutation dans la sous-unité c et une souche résistante non mutée. Aucune mutation n'a été détectée.

2. Complémentation génique

Un test de complémentation génique consiste en l'introduction d'un gène d'intérêt dans une souche bactérienne avec un phénotype bien défini afin de voir si ce gène peut induire une modification du phénotype de la souche.

L'ensemble de nos travaux ont permis l'identification de 7 mutations différentes dans la sous-unité c de l'ATP synthase mycobactérienne impliquées dans la résistance acquise au TMC207 (voir Tableau 8) ainsi que l'identification d'un polymorphisme impliqué dans la résistance naturelle (A63M) (Petrella, Cambau et al. 2006). Afin de mieux caractériser chaque mutation et évaluer le niveau de résistance qu'elles confèrent, nous avons mis au point un protocole de complémentation génique chez *M. smegmatis*.

Les travaux préliminaires ont porté sur la vérification du nombre de copie du gène *atpE* présent dans le génome de *M. smegmatis* (comme nous l'avons fait pour le génome de *M. tuberculosis* – voir chapitre Résultats – Etude de la résistance au TMC207, paragraphe 1. page 109). Le génome a été digéré avec chacune des enzymes *Pst*I, *BstE*II, *Nhe*I ou *Bgl*II et les fragments obtenus ont été

séparés grâce à une électrophorèse classique ou une électrophorèse en champs pulsé afin de mieux séparer les grands fragments. La sonde contre le gène *atpE* s'hybride sur un seul fragment du génome digéré par chaque enzyme. La taille du fragment sur lequel s'hybride la sonde correspond à la taille du fragment théorique. Pour les digestions avec *Pst*I et *BstE*II nous avons respectivement une bande à environ 3100 pb et 1700 pb (non montré), et pour les digestions avec *Nhe*I et *Bgl*II respectivement une bande à environ 56 700 pb et 27 400 pb (Figure 43). Une seule copie du gène *atpE* est donc présente dans le génome de *M. smegmatis*.

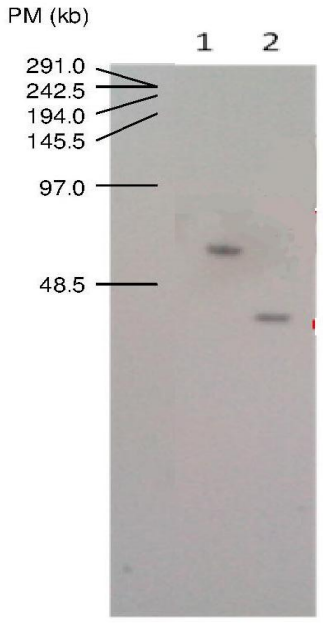


Figure 43. Southern Blot avec une sonde s'hybridant sur le gène *atpE* des digestions du génome de *M. smegmatis* avec *Nhe*I et *Bgl*II. Puits 1 : digestion avec *Nhe*I. Puits 2 : digestion avec *Bgl*II.

Pour les tests de complémentation, une souche sauvage de *M. smegmatis* a été transformée avec le plasmide pLYG204.zeo portant le gène *atpE* de *M. smegmatis* (pLYGatpEsme) muté aux positions identifiées chez les mutants mycobactériens résistants à la drogue et chez les espèces naturellement résistantes. Une souche sauvage de *M. smegmatis* a également été transformée avec le gène *atpE* de *M. tuberculosis* (pLYGatpEBK) muté aux positions identifiées uniquement dans cette espèce. Les différentes souches complémentées sont reportées dans le Tableau 9.

Souche transformée	Gène cloné dans le vecteur pLYG204.zeo	Mutation dans la protéine	Origine de la mutation
M. smegmatis mc^{2}155 wild type	*atpE* of *M. smegmatis*	I66M D28V	*M. smegmatis*
M. smegmatis mc^{2}155 wild type	*atpE* of *M. smegmatis*	A63P D28G E61D L59V	*M. tuberculosis*
M. smegmatis mc^{2}155 wild type	*atpE* of *M. smegmatis*	D28A	*M. abscessus* *M. fortuitum*
M. smegmatis mc^{2}155 wild type	*atpE* of *M. smegmatis*	A63M	*M. xenopi** *M. novocastrense** *M. shimoidei**
M. smegmatis mc^{2}155 wild type	*atpE* of *M. tuberculosis*	A63P D28G E61D L59V I66M	*M. tuberculosis*

Tableau 9. Constructions utilisées pour les tests de complémentation génique chez *M. smegmatis*. *Chez *M.* xenopi, *M. novocastrense* et *M. shimoidei,* le résidu à la position 63 est naturellement une méthionine. La numérotation est celle de *M. tuberculosis*.

Afin de déterminer le niveau de résistance au TMC207 que chaque mutation confère, les CMIs pour la molécule ont été mesurées pour chaque souche complémentée.

Comme indiqué dans le Tableau 10, les quatre souches témoins, c'est à dire la souche sauvage, la souche complémentée avec le plasmide sans insert, et les souches complémentées avec le gène *atpE* sauvage de *M. smegmatis* et *M. tuberculosis* (vecteurs pLYGatpEsme^{wt} et pLYGatpEBK^{wt}), ont toutes une CMI pour le TMC207 de 0.12 µg/ml. Ni la présence du plasmide pLYG204.zeo dans la souche, ni la présence d'une copie du gène *atpE* sauvage dans le vecteur ne modifient la sensibilité de la bactérie au TMC207.

Les souches complémentées avec le gène *atpE* codant pour la sous-unité c de *M. smegmatis* portant les mutations D28V, D28A et D28G ont un haut niveau de résistance au TMC207, avec des valeurs de CMI de 16 µg/ml (une augmentation de 133 fois par rapport à la CMI de la souche sauvage). Les souches de *M. smegmatis* exprimant une sous-unité c portant la mutation E61D ou I66M montrent également une augmentation significative du niveau de

résistance au TMC207, avec des valeurs de CMI respectivement de 4 µg/ml et 8 µg/ml (33 et 66 fois la CMI de la souche sauvage). Les valeurs les plus basses de CMI ont été obtenues dans les tests de complémentation réalisés avec les mutations L59V, A63M et A63P. Ces mutations confèrent en effet une CMI pour le TMC207 de 0.5 µg/ml, qui correspond à une augmentation de 4 fois la CMI de la souche sauvage (Tableau 10).

Les tests de complémentation de la souche sauvage de *M. smegmatis* avec le plasmide portant le gène *atpE* de *M. tuberculosis* muté aux positions identifiées chez les mutants de *M. tuberculosis* résistants au TMC207 (c'est-à-dire D28G, L59V, E61D, A63P et I66M) ont donné des résultats inattendus. Pour toutes les souches complémentées, la CMI pour le TMC207 est de 0.12 µg/ml, elle est donc identique à la CMI de la souche sauvage non complémentée (Tableau 10).

Hôte	Gène et origine	Mutation	Plasmide recombinant	CMI (µg/ml)
***M. smegmatis* mc^{2}155**	aucun	aucune	aucun	0.12
	aucun	aucune	pLYG204	0.12
	atpE de *M. smegmatis*	aucune	pLYGatpEsme^{wt}	0.12
	atpE de *M. tuberculosis*	aucune	pLYGatpEBK^{wt}	0.12
***M. smegmatis* mc^{2}155**	*atpE* de *M. smegmatis*	D28V	pLYGatpEsme^{D28V}	**16**
		D28A	pLYGatpEsme^{D28A}	**16**
		D28G	pLYGatpEsme^{D28G}	**16**
		I66M	pLYGatpEsme^{I66M}	**8**
		E61D	pLYGatpEsme^{E61D}	**4**
		L59V	pLYGatpEsme^{L59V}	**0.5**
		A63P	pLYGatpEsme^{A63P}	**0.5**
		A63M	pLYGatpEsme^{A63M}	**0.5**
***M. smegmatis* mc^{2}155**	*atpE* de *M. tuberculosis*	D28G	pLYGatpEBK^{D28G}	0.12
		L59V	pLYGatpEBK^{L59V}	0.12
		E61D	pLYGatpEBK^{E61D}	0.12
		A63P	pLYGatpEBK^{A63P}	0.12
		I66M	pLYGatpEBK^{I66M}	0.12

Tableau 10. CMIs du TMC207 pour toutes les souches complémentées construites. Pour chaque souche complémentée la mutation présente dans la sous-unité c est indiquée en exposant à côté du nom du plasmide.

3. Inactivation du gène *atpE*

L'inactivation génique est une technique essentielle pour comprendre la fonction des gènes, mais c'est une technique qui reste encore difficile à mettre au point notamment chez les mycobactéries.

Une des méthodes les plus courantes pour inactiver un gène est l'utilisation d'une cassette d'inactivation ou d'un vecteur d'inactivation. Un vecteur d'inactivation est un plasmide qui porte un insert constitué d'un marqueur de résistance encadré par deux régions homologues à la zone du génome où se trouve le gène que l'on veut inactiver (cet insert est appelé « cassette d'inactivation »). Le plasmide est dit « suicide » car il ne possède pas d'origine de réplication spécifique aux mycobactéries il ne peut donc pas persister dans la bactérie sans s'intégrer totalement au partiellement au génome de celle-ci. Pour inactiver le gène, l'insertion dans le génome doit se faire grâce à un double événement de recombinaison entre les régions encadrant le marqueur, qui sont présentes dans la cassette d'inactivation et les régions homologues du génome. Ce double événement de recombinaison conduit à l'insertion du marqueur dans le gène d'intérêt, et à son inactivation. Le plasmide peut aussi contenir d'autres gènes marqueurs pour aider à sélectionner les clones inactivés (Figure 44).

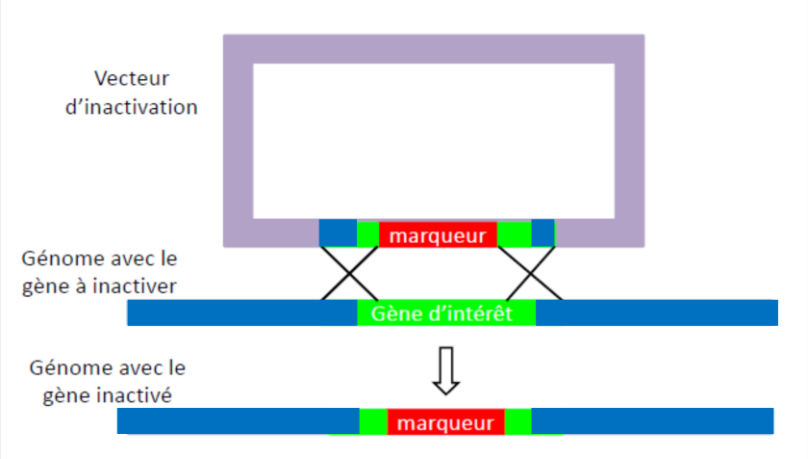


Figure 44. Inactivation d'un gène d'intérêt. Le vecteur suicide porte le marqueur encadré par deux régions homologues au génome de l'organisme à modifier. Grâce à deux événements de recombinaison, le marqueur est inséré dans le génome à la place du gène à inactiver.

Notre objectif était l'inactivation du gène *atpE* chromosomique sauvage dans les souches de *M. smegmatis* complémentées avec le gène *atpE* muté porté par le plasmide pLYG204.zeo. Le but était d'affiner les résultats de la complémentation génique afin de déterminer le phénotype que confère chaque mutation dans un système isogénique, sans interférence liée à la présence du gène chromosomique (niveau de résistance au TMC207, différence de croissance de la bactérie, quantité d'ATP cellulaire différente…).

Pour construire une cassette d'inactivation pour les mycobactéries, il a été montré par Tran SL et collègues (Tran and Cook 2005) et Stéphan J et collègues (Stephan, Stemmer et al. 2004) que 1000 pb sont suffisantes pour permettre une recombinaison homologue chez *M. smegmatis.* Le marqueur de résistance le plus couramment utilisé chez *M. smegmatis* permettant de confirmer l'inactivation d'un gène, est le gène *aph* qui confère la résistance à la kanamycine (Boshoff and Mizrahi 1998; Galamba, Soetaert et al. 2001). Enfin, pour construire un vecteur d'inactivation spécifique aux mycobactéries, nous nous sommes procurés grâce à Tania Parish les vecteurs pGOAL19 et p2NIL (Parish and Stoker 2000).

Au niveau méthodologique, notre stratégie a donc été de construire une cassette et un vecteur d'inactivation. La cassette d'inactivation est constituée du gène de résistance à la kanamycine (*aph*) encadré par deux fragments d'environ 1000 pb chacun. Le fragment 1 correspond à 35 pb du début du gène *atpE* et à la région en amont de ce gène. Le fragment 2 corresponde à 18 pb de la fin du gène *atpE* et à la région en aval de ce gène (voir chapitre Matériel et Méthodes, paragraphe 2.6. Figure 32 page 81). Pour éviter une modification de la transcription ou de la traduction des gènes de l'opéron *atp* en aval de l'insertion de la cassette d'inactivation (mutations polaires), nous avons construit une cassette contenant le gène *aph* sans promoteur et sans terminaison de transcription. En amont de ce gène, nous avons introduit des codons stop (3 codons stops accessibles dans les 3 phases de lecture) et un site de liaison pour le ribosome. En aval, nous avons introduit un autre site de liaison du ribosome et un codon start (Figure 45), comme décrit par Ménard et al. (Menard, Sansonetti et al. 1993).

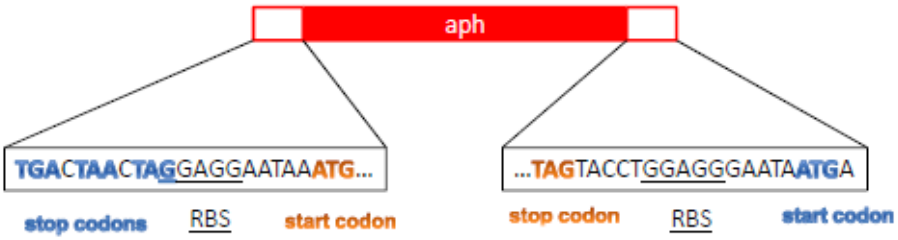


Figure 45. Séquence du gène *aph* introduit dans le plasmide suicide.

Au niveau expérimental, la cassette d'inactivation a été construite grâce à une méthode d'amplification spécifique, la Long-Flanking Homology-PCR (LFH-PCR). Les 3 fragments ont d'abord été amplifiés séparément puis associés par LFH-PCR (Figure 46)

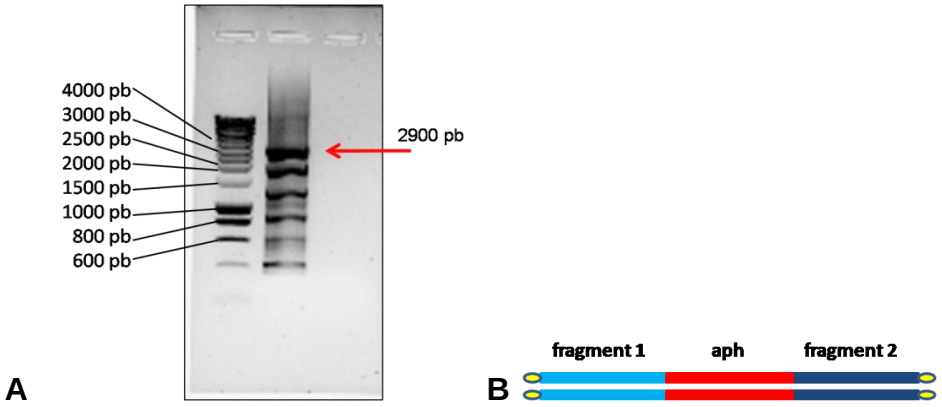


Figure 46. Création de la cassette d'inactivation par LFH-PCR. (A) Gel d'agarose de la LFH-PCR permettant d'associer les trois fragments. La flèche rouge indique la bande correspondant aux trois fragments liés. (B) schéma de la cassette d'inactivation.

Sur le gel Figure 46A nous observons une bande à environ 2900 pb correspondant à la cassette d'inactivation assemblée. Les autres bandes présentes sur le gel sont les trois fragments séparés, ou les fragments liés deux par deux, ou encore des amplifications aspécifiques (Figure 47).

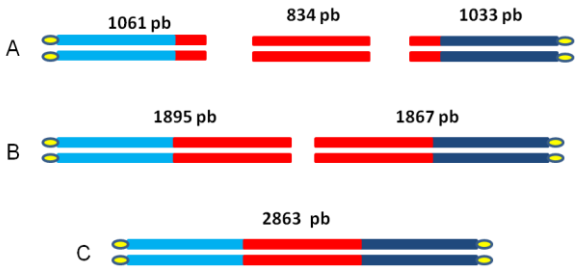


Figure 47. Produits d'amplification visibles sur le gel à la Figure 46A. (A) Les trois fragments séparés, (B) les fragments liés deux par deux, (C) la cassette d'inactivation complète.

Cette cassette d'inactivation a été introduite dans *M. smegmatis* par électroporation. Les souches transformées sont la souche de *M. smegmatis* complémentée avec la sous-unité c sauvage et les souches complémentées avec la sous-unité c mutée A63P ou I66M. D'après la littérature, la transformation de la seule cassette d'inactivation suffit pour obtenir de bon résultats d'inactivation chez *E. coli* (Murphy, Campellone et al. 2000), chez *Saccharomyces cerevisiae* (Wach 1996) et chez *Synechocystis sp.* PCC6803 (Taroncher-Oldenburg and Stephanopoulos 2000). Malgré de nombreuses tentatives, aucune colonie recombinante n'a pu être obtenue par cette méthode.

Pour la construction du vecteur d'inactivation nous avons travaillé en parallèle sur deux stratégies. La première stratégie (voir Figure 34 du Paragraphe 2.7.1. des Matériel et Méthodes page 83) a été d'introduire la cassette d'inactivation obtenue par LFH-PCR dans le plasmide pGOAL19, permettant ainsi d'avoir un vecteur d'inactivation portant comme marqueurs additionnels de sélection le gène de résistance à l'hygromycine et un gène de sensibilité au sucrose. La deuxième stratégie (voir Figure 35 page 86) a été de construire la cassette d'inactivation par des étapes d'amplification, de clonage et de ligation des fragments 1 et 2 et du gène *aph* directement dans le vecteur p2NIL, puis, d'introduire dans cette construction les marqueurs de sélection (gène de résistance à l'hygromycine et gène de sensibilité au sucrose) issus du plasmide pGOAL19.

Dans la première stratégie, 4 kits de clonage différents ont été utilisés sans succès afin d'insérer la cassette d'inactivation obtenue par la LFH-PCR dans un vecteur acceptant les produits d'amplification par PCR. Cet échec était probablement du aux extrémités abimées du produit de la LFH-PCR qui empêchaient le clonage direct. Nous avons alors construit deux nouvelles amorces, appelées atpE1int et atpE4int, s'hybridant 50 pb plus à l'intérieur par rapport aux extrémités de la cassette. Le produit d'amplification de ces amorces a pu être cloné facilement dans le vecteur pCR2.1-TOPO pour obtenir le vecteur pTOPOcassette (voir Figure 34 page 83). Pour finaliser la construction, nous devions insérer la cassette dans pGOAL19 via une étape de digestion/ligation par *Bam*HI. La difficulté rencontrée à cette étape était la présence d'un site de

coupure *Bam*HI à l'intérieur de la cassette. Les différentes tentatives de mutagenèse digérée pour éliminer ce site ayant été infructueuses, nous avons alors mis au point une digestion partielle (Figure 48) par *Bam*HI permettant d'obtenir la cassette entière avec les extrémités cohésives pour son insertion dans le vecteur pGOAL19. Mais malgré les nombreuses tentatives, nous n'avons jamais réussi à cloner la cassette dans le vecteur pGOAL19.

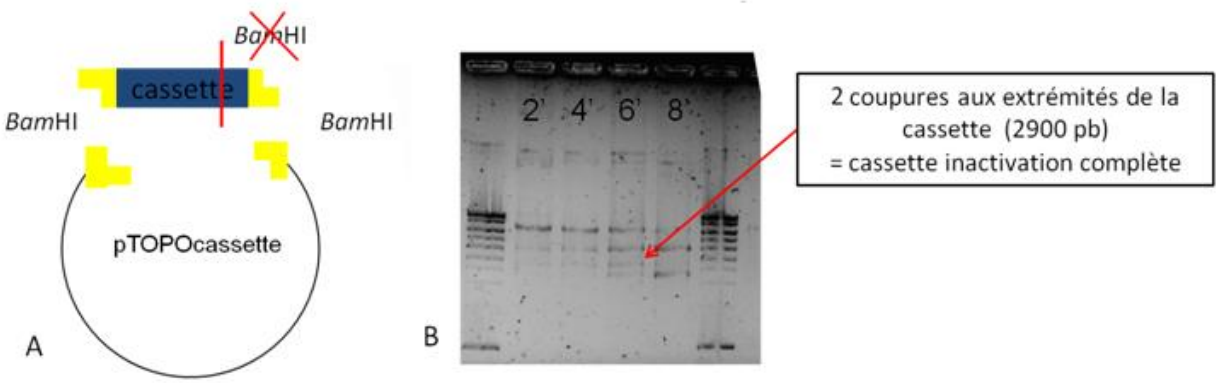


Figure 48. Digestion partielle par *Bam*HI du vecteur pTOPOcassette. (A) Schéma du résultat de la digestion (B) Digestion partielle. Les flèches indiquent les fragments générés avec leur taille.

L'utilisation de cette première stratégie nous a néanmoins permis d'obtenir un vecteur d'inactivation minimal : le pTOPOcassette (Figure 49, voir Figure 34 page 83 pour les détails de la construction). Ce vecteur est dit « minimal » car il porte le matériel nécessaire pour permettre et faciliter son insertion au niveau du gène *atpE* mais il ne contient pas les marqueurs de sélections issus de pGOAL19 permettant une sélection facilitée des clones ayant intégré la cassette d'inactivation via une double recombinaison.

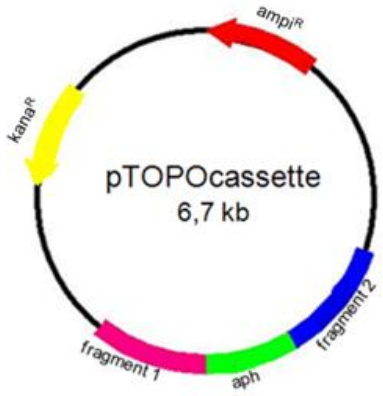


Figure 49. Vecteur pCR2.1-TOPO contenant la cassette d'inactivation (vecteur pTOPOcassette).

Les tentatives d'inactivation avec uniquement la cassette n'ayant pas permis l'obtention des colonies recombinantes, nous avons décidé d'inactiver le gène *atpE* avec cette construction plasmidique minimale, sachant que la présence de la cassette d'inactivation dans un plasmide peut faciliter son intégration dans le génome. Nous avons introduit le vecteur pTOPOcassette par électroporation dans *M. smegmatis.* Les souches transformées sont la souche de *M. smegmatis* complémentée avec la sous-unité c sauvage et les souches complémentées avec la sous-unité c mutée A63P ou I66M. Les colonies recombinantes inactivées sont sélectionnées grâce à leur résistance à la zéocine (plasmide pLYG204.zeo permettant la complémentation) et à la kanamycine (gène *aph* contenu dans la cassette d'inactivation). Au vu de ce qui a déjà été fait par d'autres équipes, l'inactivation a été tentée avec le vecteur d'inactivation « minimal » linéarisé et circulaire.

Dans un premier temps, nous avons transformé les bactéries avec le pTOPOcassette linéarisé, comme cela avait été fait de manière efficace pour inactiver des gènes chez *M. tuberculosis* (Reyrat, Berthet et al. 1995). Nos expériences ont permis l'obtention de 3 colonies recombinantes.

Dans un deuxième temps, nous avons transformé les bactéries avec le pTOPOcassette circulaire. Le vecteur a été introduit dans la bactérie sans traitement préalable, après un traitement alcalin ou après un traitement aux UV. Il a été montré par Hinds J. et collègues (Hinds, Mahenthiralingam et al. 1999) que ces deux derniers traitements sont très efficaces pour favoriser une recombinaison homologue chez les mycobactéries, probablement à cause de l'endommagement de l'ADN qui entraîne à l'intervention des systèmes de réparation bactériens favorisant la recombinaison des séquences homologues. L'inactivation avec le pTOPOcassette circulaire non traité a permis l'obtention de 12 colonies recombinantes ; l'inactivation avec le pTOPOcassette circulaire traité à la soude n'a pas permis d'obtenir de colonies ; enfin, l'inactivation avec le pTOPOcassette circulaire traité aux UV a permis l'obtention de 75 colonies recombinantes. L'analyse de la totalité des clones a été faite par PCR et Southern Blot. Les résultats obtenus, qui étaient identiques pour tous les clones, sont détaillés ci-dessous.

Toutes les colonies recombinantes, qui ont été sélectionnées sur des milieux contenant la kanamycine, possédaient le gène *aph* (confirmé par PCR), ce qui indique que la cassette d'inactivation est bien présente dans les bactéries. Nous avons ensuite cherché à savoir si l'intégration de la cassette au sein du génome était due à un simple ou à un double événement de recombinaison. Pour cela nous avons effectué deux PCRs avec deux couples d'amorces permettant de vérifier si le gène *atpE* a été inactivé (comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes, paragraphe 2.1.5. Figure 29 page 70). La première PCR avec les amorces atpE1 et atpE4 donne une amplification d'un fragment de 2200 pb (Figure 50, puits 5-7), indiquant que le gène chromosomique n'est pas inactivé. La deuxième PCR avec les amorces atpBS et atpFAS donne deux produits d'amplification d'environ 500 pb et 1200 pb (Figure 50, puits 1-3). L'obtention simultanée de ces deux produits d'amplification est la preuve que le gène *atpE* chromosomique est bien intact et également que la cassette d'inactivation est présente quelque part dans le génome des bactéries.

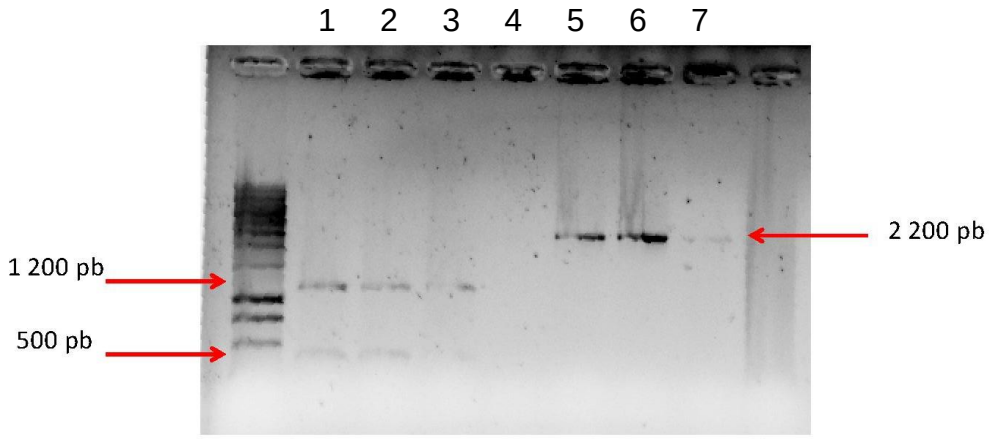


Figure 50. Amplifications obtenus avec les amorces atpBS/FAS (puits 1-2-3) et atpE1/atpE4 (puits 5-6-7) pour 3 colonies recombinantes.

L'étape suivante a été d'effectuer un Southern Blot avec 3 sondes différentes (comme décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes, paragraphe 2.3.2 Figure 30 page 73). Le Southern Blot réalisé sur l'ADN total des clones recombinants après digestion par *Bcl*I avec une sonde s'hybridant sur le gène *aph* montre la présence d'une bande à environ 5000 pb (résultats non montrés), indiquant que le gène *aph* est présent et est localisé dans le vecteur d'inactivation.

L'absence d'autres bandes est plutôt en faveur de l'échec de l'inactivation du gène *atpE.* Le Southern Blot réalisé avec une sonde s'hybridant sur le gène *atpB* porte à la révélation de deux fragments d'ADN, dont la taille est d'environ 1200 pb et 5000 pb (résultats non montrés). Ceci indique que le génome de ces clones recombinants contient le gène *atpE* sauvage et également la cassette d'inactivation. Enfin, nous avons réalisé un troisième Southern Blot avec une sonde s'hybridant sur le vecteur d'inactivation mais pas sur la cassette. L'hybridation avec cette sonde allume un seul fragment de 5000 pb confirmant la présence du vecteur d'inactivation dans le génome de la bactérie (résultats non montrés).

Pour résumé, l'ensemble des résultats obtenus par PCR et Southern Blot nous permet d'affirmer que le gène *atpE* chromosomique n'a pas été inactivé. Nous avons également montré que le vecteur d'inactivation avec la cassette est présent dans le génome des clones recombinants, introduit par un événement de simple recombinaison comme schématisé sur la Figure 51. De plus, étant donné que les mêmes fragments ont été allumés en Southern Blot pour toutes les colonies, on peut penser que cet événement est issu d'une recombinaison à un site spécifique, même si nous ne pouvons pas le prouver expérimentalement.

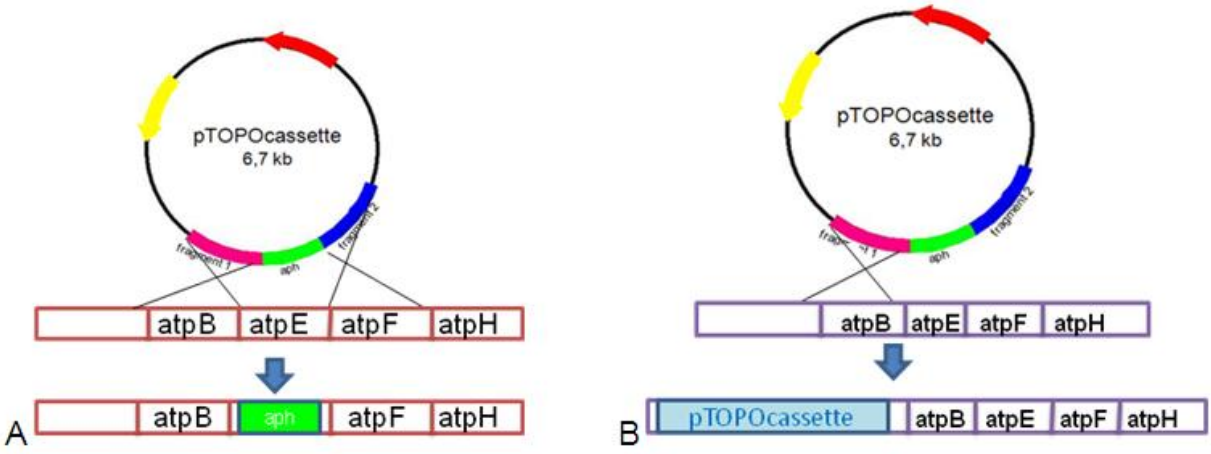


Figure 51. Inactivation d'*atpE* par pTOPOcassette. En jaune le gène de résistance à la kanamycine et en rouge le gène de résistance à l'ampicilline du vecteur pCR2.1-TOPO pour la sélection chez *E. coli*, en vert le gène *aph*, en fuchsia et en bleu respectivement les fragments 1 et 2. (A) Deux événements de recombinaison dans la bactérie portent à l'inactivation du gène *atpE*, par contre (B) un seul événement porte à l'insertion de pTOPOcassette dans le génome.

Dans la deuxième stratégie de construction d'un vecteur d'inactivation que nous avons entreprise afin d'obtenir un vecteur contenant tous les marqueurs de sélection (voir Figure 35 page 86), le problème a été la ligation des 3 fragments constituant la cassette d'inactivation dans le plasmide p2NIL. L'approche par ligation simultanée des 3 fragments n'ayant pas permis l'obtention de colonies recombinantes, nous avons cloné séparément chaque fragment dans p2NIL. La ligation du fragment 1 dans le plasmide p2NIL linéarisé par *Sca*I et *Hind*III a porté à la construction du plasmide p2NILI (Figure 52C). Le gène *aph* a ensuite été lié juste après le fragment 1 permettant l'obtention du plasmide p2NILII (Figure 52C). Même en variant les conditions de la réaction, nous n'avons pas réussi à lier le fragment 2 dans le vecteur p2NILII, empêchant ainsi la construction d'un vecteur d'inactivation complet par cette deuxième stratégie.

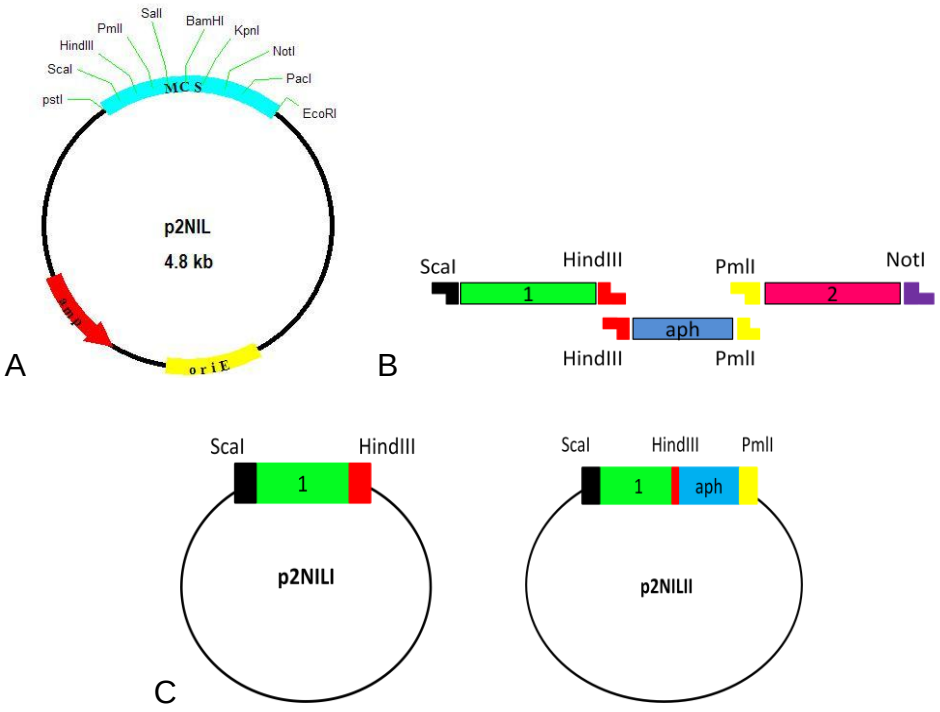


Figure 52. Vecteur d'inactivation construit à partir de p2NIL. (A) Vecteur p2NIL. (B) Fragments 1 et 2 et gène *aph* avec les extrémités cohésives permettant des clonages successifs dans p2NIL. (C) Schéma des deux constructions (p2NILI et p2NILII) obtenues.

4. Un autre mécanisme de résistance ?

Parmi les colonies résistantes au TMC207 sélectionnées *in vitro*, 47% des colonies de *M. abscessus* et 60% de *M. tuberculosis* ne sont pas mutées dans la sous-unité c de l'ATP synthase, ce qui laisse envisager l'existence d'un autre mécanisme de résistance au TMC207 dans ces clones.

Afin d'exclure l'implication de la sous-unité a de l'ATP synthase mycobactérienne, pour laquelle il a été proposé qu'elle puisse interagir avec le TMC207 (de Jonge, Koymans et al. 2007), le gène *atpB* (codant pour la sous-unité a) des clones de *M. abscessus* et *M. tuberculosis* résistants à la drogue a été amplifié et séquencé (voir chapitre Résultats – Etude de la résistance au TMC207, Paragraphe 1, page 109). Aucune mutation n'a été identifiée, que ce soit pour les clones mutés dans la sous-unité c ou pour les clones non mutés. Ces résultats, associés aux résultats du séquençage de l'opéron *atp* complet pour les clones de *M. tuberculosis* (chapitre Résultats - Etudes de la résistance au TMC207, paragraphe 1, page 109), permettent d'affirmer que la résistance au TMC207 dans ces clones résistants n'est pas liée à la présence de mutation dans les gènes *atpE, atpB*, et dans les autres gènes constituants l'opéron *atp*.

Nous avons formulé l'hypothèse que la résistance au TMC207 de ces clones pouvait être due à une surexpression de l'ATP synthase, de manière à ce que les molécules du TMC207 ne soient jamais assez nombreuses pour inhiber la totalité des enzymes présentes. Il existe à ce jour un seul système décrit dans la littérature pour réguler la transcription de l'opéron *atp* des mycobactéries, le système homologue à BlaI/BlaR (Sala, Haouz et al. 2009). Chez *M. tuberculosis,* le gène homologue à *blaI*, codant pour un répresseur de la transcription, est *rv1846c* et l'homologue de *blaR*, codant pour un récepteur transmembranaire, est *rv1845c*. Un des sites opérateurs permettant la fixation de BlaI a été identifié en amont de l'opéron *atp*. Le système BlaI/BlaR n'ayant jamais été décrit chez *M. abscessus*, nous avons recherché par comparaison de séquence dans le génome de la bactérie les gènes correspondant à *rv1846c*/*rv1845c*. Nous avons ainsi pu déterminer que le gène homologue à *rv1846c* (*blaI*) est *mab_2414,* le gène homologue à *rv1845c (blaR)* est *mab_2415* et nous avons également identifié, 243 pb en amont du codon start du gène *atpI,* une séquence identique à celle

décrite chez *M. tuberculosis,* TACGAC - - - - - GTAGTA, pouvant correspondre au site de fixation de BlaI en amont de son opéron *atp*. Nous avons amplifié et séquencé les gènes correspondants à *blaI*, *blaR* et le site opérateur chez *M. tuberculosis* et *M. abscessus* afin de voir si une modification d'une des deux protéines ou de la région régulatrice pouvait être à l'origine d'une dérépression de l'opéron *atp,* pouvant entraîner une production plus abondante d'ATP synthase. L'analyse des séquences de toutes les colonies testées montre qu'il n'y a pas de mutation.

Dans la suite du travail, nous nous sommes concentrés sur les clones de *M. abscessus* résistants au TMC207 non mutés dans la sous-unité c. Les valeurs des CMIs pour le TMC207 de ces colonies sont toutes supérieures à la valeur mesurée pour la CMI de la souche sauvage (Tableau 11). Les valeurs obtenues varient de 2 µg/ml à 8 µg/ml, soit de 4 à 16 fois la CMI du sauvage (0.5 µg/ml).

Nom de la souche de *M. abscessus*	CMI pour le TMC207 (µg/ml)
sauvage	0,5
2.1	4
3.1	≥ 8
4.1	nd
5.1	4
1.05	2
2.05	2
3.05	4
4.05	4
5.05	nd

Tableau 11. CMI pour le TMC207 des clones de *M. abscessus* résistants au TMC207 sans mutation dans la sous-unité c de l'ATP synthase.

Afin de quantifier l'ARNm du gène *atpE* nous avons fait des expériences de RT-PCR en temps réel. Avec des sondes Taqman nous avons comparé l'expression de l'ARNm du gène *atpE* à l'expression de l'ARNm de deux gènes de ménage, *sigA* (codant pour un facteur sigma de l'ARN polymérase) et *rpoB* (codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase), ainsi qu'à celui de l'ARNr 16S.

Six souches de *M. abscessus* ont été choisies pour cette expérience :

- la souche sauvage
- 3 souches non-mutées dans la sous-unité c : 3.1, 5.1 et 1.05 (CMI pour le TMC207 dans le Tableau 11)

- 2 souches mutées dans la sous-unité c : A4 (CMI = 16 µg/ml) et A6 (CMI = 8 µg/ml)

L'expression des ARNs des 4 gènes dans chaque souche résistante cultivée sans et avec TMC207 a été comparée par rapport à l'expression dans la souche sauvage. Pour chaque souche chaque réaction de RT-PCR en temps réel a été faite deux fois dans deux réactions indépendantes. Les courbes d'amplification des réactions sont visibles en Figure 53 :

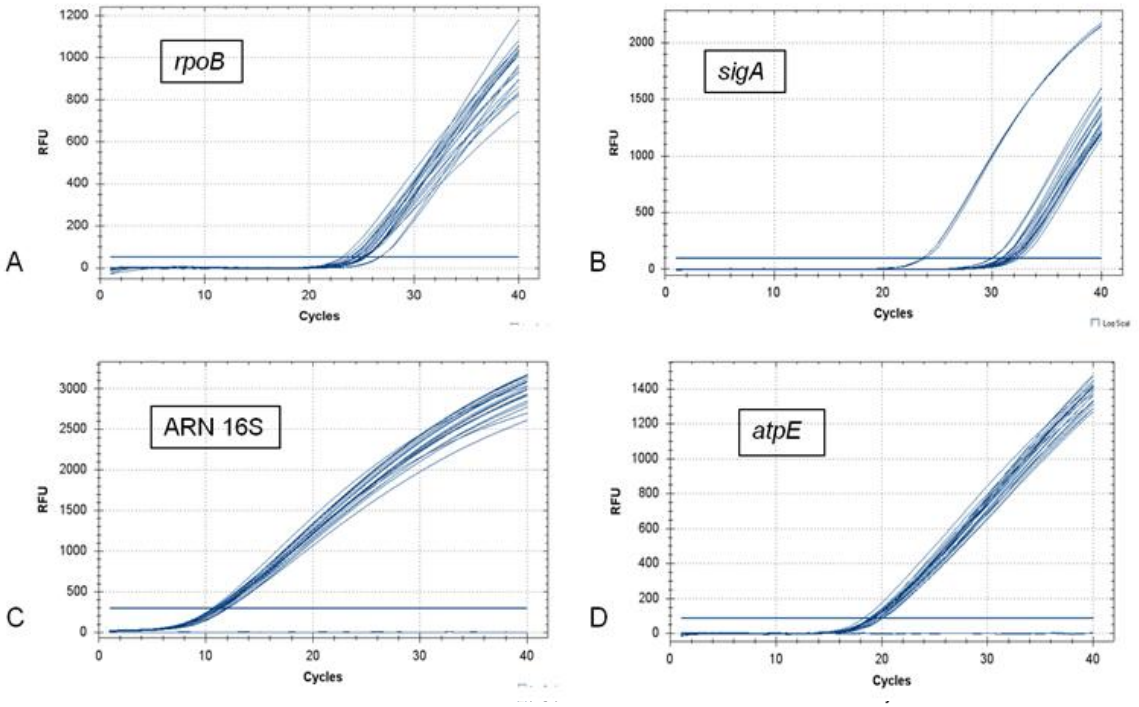


Figure 53. Courbe d'amplification de la RT-PCR en temps réel pour les 4 ARN : (A) *rpoB*, (B) *sigA* – les trois échantillons qui donnent des courbes avec un Ct très différents par rapport aux autres n'ont pas été pris en compte dans l'analyse des données, (C) ARN 16S (D) *atpE.*

Le Ct pour l'ARN 16S (en moyenne entre 10.96 et 12.01) des 6 souches est inférieur aux Ct obtenu pour les autres gènes, témoignant d'une quantité plus abondante d'ARNr par rapport à l'ARNm dans la bactérie. Les deux autres gènes de référence, *sigA* et *rpoB*, ont des Ct respectivement en moyenne entre 29.96 et 32.23 et entre 23.25 et 26.69.

L'analyse des données a été faite en comparant l'expression du gène *atpE* dans les souches résistantes au TMC207 par rapport à la souche sauvage. Cette expression a été normalisée en se référant aux valeurs mesurées pour les gènes de référence. Les résultats ont été reportés dans la Figure 54.

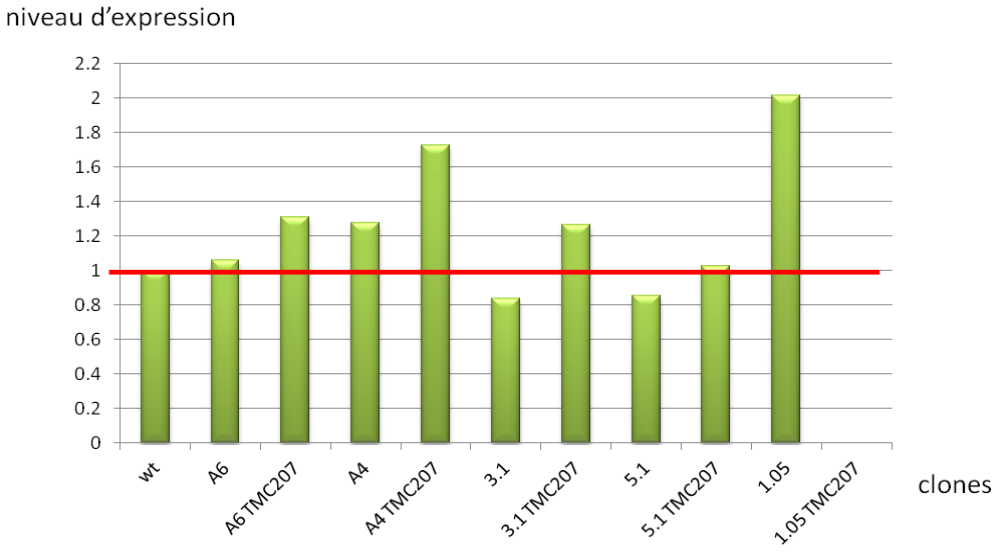


Figure 54. Niveau d'expression du gène *atpE* dans les souches résistantes cultivées sans et avec TMC207 par rapport à la souche sauvage (wt). Les données de la souche 1.05 cultivée avec TMC207 n'ont pas pu être déterminées. La ligne rouge indique le niveau de référence de la souche sauvage.

Lorsque l'on compare le niveau d'expression dans toutes les souches par rapport à la souche sauvage, on voit que les variations ne sont pas homogènes. Si on considère les souches cultivées sans antibiotique, pour les souches A6 et A4, le niveau d'expression est respectivement identique ou 1.3 fois plus élevée, alors que pour les souches 3.1, 5.1 et 1.05, le niveau d'expression est soit légèrement inférieur pour les deux premières, soit 2 fois plus élevé pour la souche 1.05. Les mêmes souches cultivées en présence du TMC207 ont toutes un niveau d'expression plus élevée, ce qui indique qu'il y a une augmentation de la quantité d'ARNm du gène *atpE* dans toutes les souches cultivées en présence du TMC207 par rapport aux mêmes souches cultivées sans l'antibiotique.

En conclusion, ces résultats montrent qu'il y a une augmentation significative de la quantité d'ARNm du gène *atpE* dans toutes les souches quand elles sont cultivées en présence du TMC207, qu'elles soient mutées ou non mutées dans la sous-unité c. En revanche, on n'observe pas d'induction significative de l'expression de l'ATP synthase dans les clones résistants au TMC207 ne présentant pas de mutation dans la sous-unité c, exception fait du clone 1.05. Ces résultats ne permettent pas d'affirmer avec certitude qu'un deuxième mécanisme de résistance au TMC207 pourrait être la surexpression de l'ATP synthase.

5. Modèles structuraux des anneaux c de *M. tuberculosis* et de *M. smegmatis*

La structure 3D d'un anneau c d'ATP synthase mycobactérienne n'étant pas encore disponible, nous avons modélisé la structure 3D de l'anneau c des mycobactéries afin de pouvoir réaliser une interprétation au niveau structural des différentes informations présentées dans la première partie des résultats, et ainsi proposer une hypothèse sur la fixation de la drogue sur sa cible et sur son mode d'action,

L'analyse de l'alignement des séquences de la sous-unité c des 4 espèces mycobactériennes incluses dans notre étude apporte plusieurs informations (Figure 55 – Tableau 12). Tout d'abord, l'identité de séquence de la sous-unité c entre ces 4 espèces est très élevée, avec des pourcentages d'identité variant de 85% jusqu'à 98%. Il existe quelques différences de séquence localisées principalement dans les régions N- et C-terminales. Chez *M. smegmatis* et *M. fortuitum* (identité de séquence la plus élevée : 98%), on note la présence d'une extension N-terminale de 4 acides aminés par comparaison avec celle de *M. tuberculosis*. La région C-terminale est également variable, avec 3 résidus G[A/L][S/Q] chez *M. abscessus*, *M. fortuitum* et *M. smegmatis,* contre 2 résidus VK chez *M. tuberculosis*. Les autres acides aminés différents sont disséminés dans la séquence aux positions 6 (V/A/T), 18 (A/G), 30 (I/V) et 39 (V/I) (numérotation de *M. tuberculosis*). Nous constatons également que les acides aminés trouvés substitués dans les souches résistantes au TMC207 sont conservés au sein des 4 espèces (Figure 55 – résidus encadrés).

Nous avons également réalisé un alignement de séquences des sous-unités c des mycobactéries avec les sous-unités c issues des anneaux c dont la structure 3D a été résolue. Ces 4 structures sont celles de 3 bactéries, *Ilyobacter tartaricus* (résolution 2.35 Å, code PDB 2WGM) (Meier, Krah et al. 2009), *Spirulina platensis* (résolution 2.1 Å, code PDB 2WIE) (Pogoryelov, Yildiz et al. 2009), *Bacillus pseudofirmus* OF4 (résolution 2.5 Å, code PDB 2X2V) (Preiss, Yildiz et al. 2010), et du chloroplaste (résolution 3.9 Å, code PDB 2W5J) (Vollmar, Schlieper et al. 2009). Parmi ces 4 structures, les ATP synthases de *S. platensis, B. pseudofirmus* et du chloroplaste sont des ATP synthases à H^+, celle de *I.*

tartaricus est une ATP synthase à Na^+. L'analyse de l'alignement révèle une conservation de séquences très faible entre les différentes espèces (Figure 55 – Tableau 12) avec des valeurs variant de 27% à 36%. Si on considère les résidus impliqués dans la fixation ou la stabilisation de l'ion H^+/Na^+ dans l'anneau c (Figure 55 – résidus surlignés en noir), le seul résidu conservé chez toutes les espèces est le glutamate qui occupe la position 61 (numérotation de *M. tuberculosis*). De façon intéressante, l'alignement multiple indique que la plupart des acides aminés impliqués dans la liaison de l'ion H^+/Na^+ sont superposables aux acides aminés pour lesquels nous avons trouvé des substitutions dans les souches mycobactériennes résistantes au TMC207 (Figure 55 – résidus encadrés et résidus surlignés en noir).

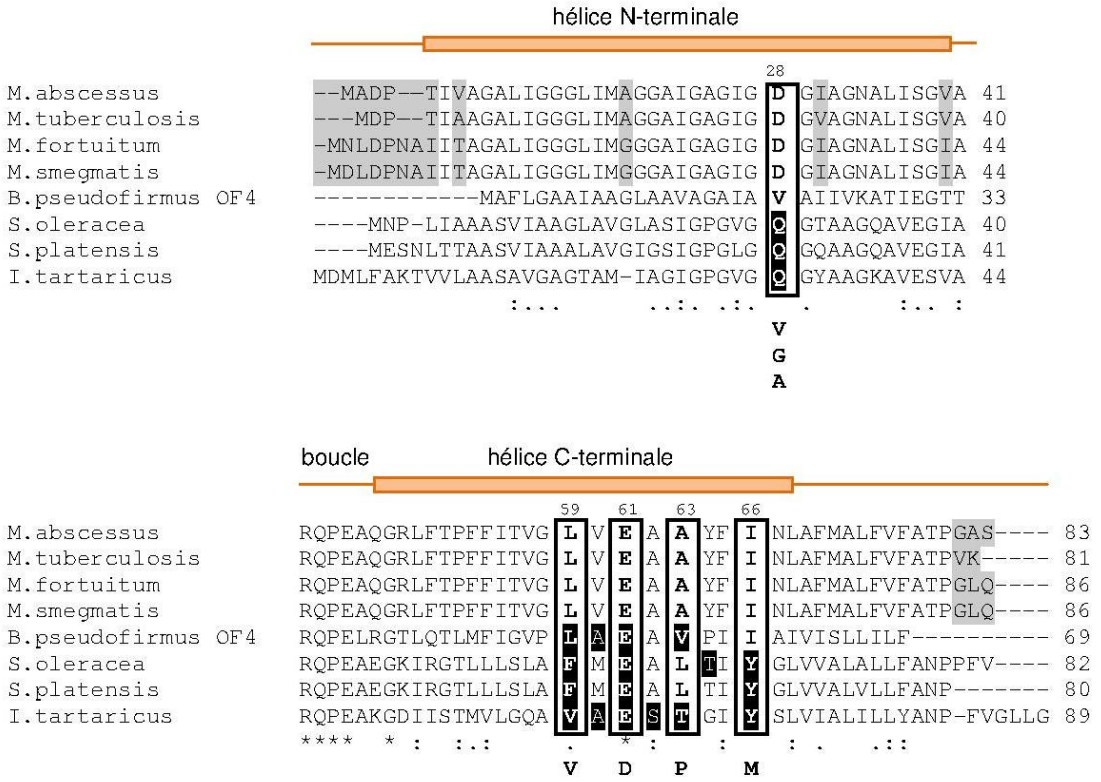


Figure 55. Alignement des séquences de la sous-unité c de *M. abscessus*, *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *B. pseudofirmus* OF4, chloroplaste (*Spinacia olaracea*), *S. platensis* et *I. tartaricus*. La numérotation est celle de *M. tuberculosis*. Les acides aminés en gris sont les acides aminés non conservés au sein des espèces mycobactériennes. Les acides aminés trouvés substitués dans les souches résistantes au TMC207 sont encadrés et les substitutions correspondantes sont indiquées en dessous. Les résidus surlignés en noir correspondent aux acides aminés impliqués dans la liaison de l'ion H^+/Na^+.

	% identité			
Espèce	*M. tuberculosis*	*M. smegmatis*	*M. fortuitum*	*M. abscessus*
M. tuberculosis	100	85	86	93
M. smegmatis	85	100	98	88
M. fortuitum	86	98	100	88
M. abscessus	93	88	88	100
I. tartaricus	27	29	28	28
S. platensis	29	33	33	30
B. pseudofirmus OF4	36	30	30	36
chloroplaste	34	34	34	33

Tableau 12. Pourcentage d'identité entre les séquences en acides aminés des sous-unités c de l'ATP synthase des 4 espèces mycobactériennes (*M. tuberculosis, M. smegmatis, M. fortuitum, M. abscessus*) et de *I. tartaricus, S. platensis, B. pseudofirmus* et chloroplaste.

L'alignement multiple des séquences des sous-unités c a servi de base pour construire par modelisation par homologie les modèles structuraux des anneaux c de *M. tuberculosis*, chez qui nous avons identifié la majorité des substitutions, et de *M. smegmatis*, qui a été utilisée comme bactérie réceptrice pour les tests de complémentation. Ces modèles ont été réalisés à partir la structure cristallographique de l'ATP synthase à proton pour laquelle le score combinant l'identité de séquences, l'homologie de structures secondaires et homologie des motifs conservés étaie le plus élevé avec *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* (3D Jury Metaserver), à savoir la structure de *S. platensis* (code PDB 2WIE). Le nombre de monomères c chez les mycobactéries étant inconnu, nos modèles ont été faits en conservant le nombre de monomères présents dans la structure cristallographique utilisée comme rèférence (Figure 56).

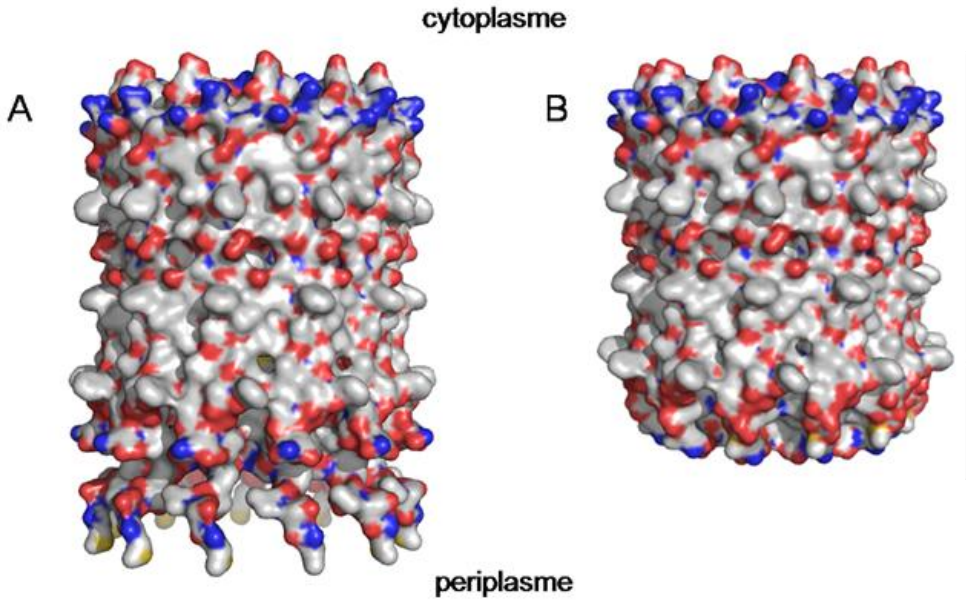


Figure 56. Représentation en surface (couleurs CPK) des modèles d'anneaux c de l'ATP synthase de (A) *M. smegmatis* et (B) *M. tuberculosis*.

Comme cela est montré sur la Figure 56, les deux modèles structuraux des anneaux complets obtenus pour les deux espèces sont très similaires, excepté au niveau des régions N- et C-terminales. En effet, la présence de 4 acides aminés supplémentaires en N-terminal chez *M. smegmatis* font que l'hélice N-terminale est plus longue chez cette espèce et s'étend en diréction du periplasme par rapport à la même région dans l'anneau c de *M. tuberculosis* (Figure 56). L'autre différence significative est la présence au niveau C-terminal d'une lysine dans la sous-unité c de *M. tuberculosis* à la place d'une glutamine chez *M. smegmatis*. Enfin, la comparaison des deux modèles a permis de montrer que les autres différences en acides aminés pointées par l'alignement de séquences n'entraînent pas de changements structuraux (non montré) et se situent dans des régions qui ne sont pas impliquées dans les parties importantes pour l'activité de l'ATP synthase, comme la zone de fixation de l'ion ou encore la boucle hydrophile conservée permettant la liaison au domaine F_1.

Le modèle structural de *M. tuberculosis* fait à partir de la structure 3D de *S. platensis* (une ATP synthase à H^+ comme celle des mycobactéries) a été utilisé pour visualiser le positionnement spatial des acides aminés substitués que nous

avons détectés dans les clones résistants au TMC207, ceci dans le but de mieux comprendre les modifications structurales induites ar ces mutations.

Une vue de la région du modèle de l'anneau c de *M. tuberculosis* au niveau du résidu conservé Glu61 est montrée sur la Figure 57A. Ce résidu est porté par l'hélice C-terminale d'un monomère (monomère A, Figure 57A) et il se trouve à l'interface entre deux monomères (monomères A et B, Figure 57A). Sa chaîne latérale est orientée vers l'intérieur de l'anneau au dessus de l'hélice N-terminale du même monomère, son carboxylate pointant vers les résidus de l'hélice C-terminale du monomère voisin (monomère B, Figure 57A).

L'analyse des structures des anneaux c de *S. platensis* (Pogoryelov, Yildiz et al. 2009), du chloroplaste (Vollmar, Schlieper et al. 2009) et de *I. tartaricus* (Meier, Polzer et al. 2005) montre que malgré la différence de composition en acides aminés dans ces trois structures, il existe dans la région englobant le glutamate conservé des liaisons intramoléculaires similaires permettant la liaison et la stabilisation de l'ion H^+ ou Na^+ (Figure 57B-D). En effet, chaque site de liaison formé par deux monomères c voisins est constitué d'acides aminés dont le plus important est le glutamate permettant l'interaction principale avec l'ion. Cette liaison est stabilisée par une interaction avec la chaîne latérale d'une glutamine (Gln32 chez *I. tartaricus*, Gln29 chez *S. platensis*, Gln28 chez le chloroplaste, correspondant à l'Asp28 chez *M. tuberculosis*, Figure 57A-D) portée par le même monomère (monomère A) que le glutamate, mais sur son hélice N-terminale. L'oxygène du carbonyle de la chaîne principale d'un résidu porté par l'hélice C-terminale du monomère B, Val63 chez *I. tartaricus*, Phe60 chez *S. platensis*, Phe59 chez le chloroplaste, correspondant à Leu59 chez *M. tuberculosis* (Figure 57A-D), contribue également à la stabilisation de l'ion en formant une liaison directe avec ce dernier. Enfin, le glutamate fait une liaison hydrogène avec le groupement hydroxyle d'une tyrosine (Tyr70 chez *I. tartaricus,* Tyr67 chez *S. platensis,* Tyr66 chez le chloroplaste, correspondant à Tyr64 chez *M. tuberculosis*, Figure 57A-D). La superposition du site de fixation de l'ion dans ces trois structures avec celle de *M. tuberculosis* (Figure 57E) nous permet de voir que la différence majeure se situe au niveau du positionnement de la tyrosine. En effet, si il y a bien une tyrosine (Tyr64) chez *M. tuberculosis,* elle est portée par le même monomère que le Glu61 (monomère A), sa chaine latérale étant globalement

parallele à celle du glutamate (Figure 58E). Dans les trois autres structures, la tyrosine et le glutamate sont portés par deux monomères différents et la chaine latérale de la tyrosine pointe vers celle du glutamate (voir Figures 58B-E). Malgré cette différence, le positionnement du groupement tyrosinate reste globalement similaire dans les quatre sites de fixation (Figure 58E).

Notre modèle nous permet également de voir que la plupart des résidus présents dans l'environnement direct du Glu61 chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* sont les résidus substitués dans les clones résistants au TMC207, à savoir le résidu Glu61 lui-même, Asp28 présent sur l'hélice N-terminale qui porte Glu61 (monomère A, Figure 57A), et Leu59, Ala63 et Ile66 qui proviennent du monomère voisin (monomère B, Figure 57A). Si on se réfère au modèle 3D de la structure cristallographique de *S. platensis,* la présence de ces résidus propres aux mycobactéries entraîne une diminution de l'encombrement stérique dans l'environnement direct du Glu61, permettant la formation d'une poche délimitée par les résidus Leu59, Glu61, Ala63, Tyr64 et Ile66 à son entrée, et Asp28 en profondeur (Figure 57A). Parmi ces résidus, Ala63 et Asp28, homologues chez *S. platensis* de Leu64 et Gln29, sont les deux résidus qui contribuent le plus à la formation d'un site de liaison autour du résidu Glu61 chez *M. tuberculosis* (Figure 57A et 57C).

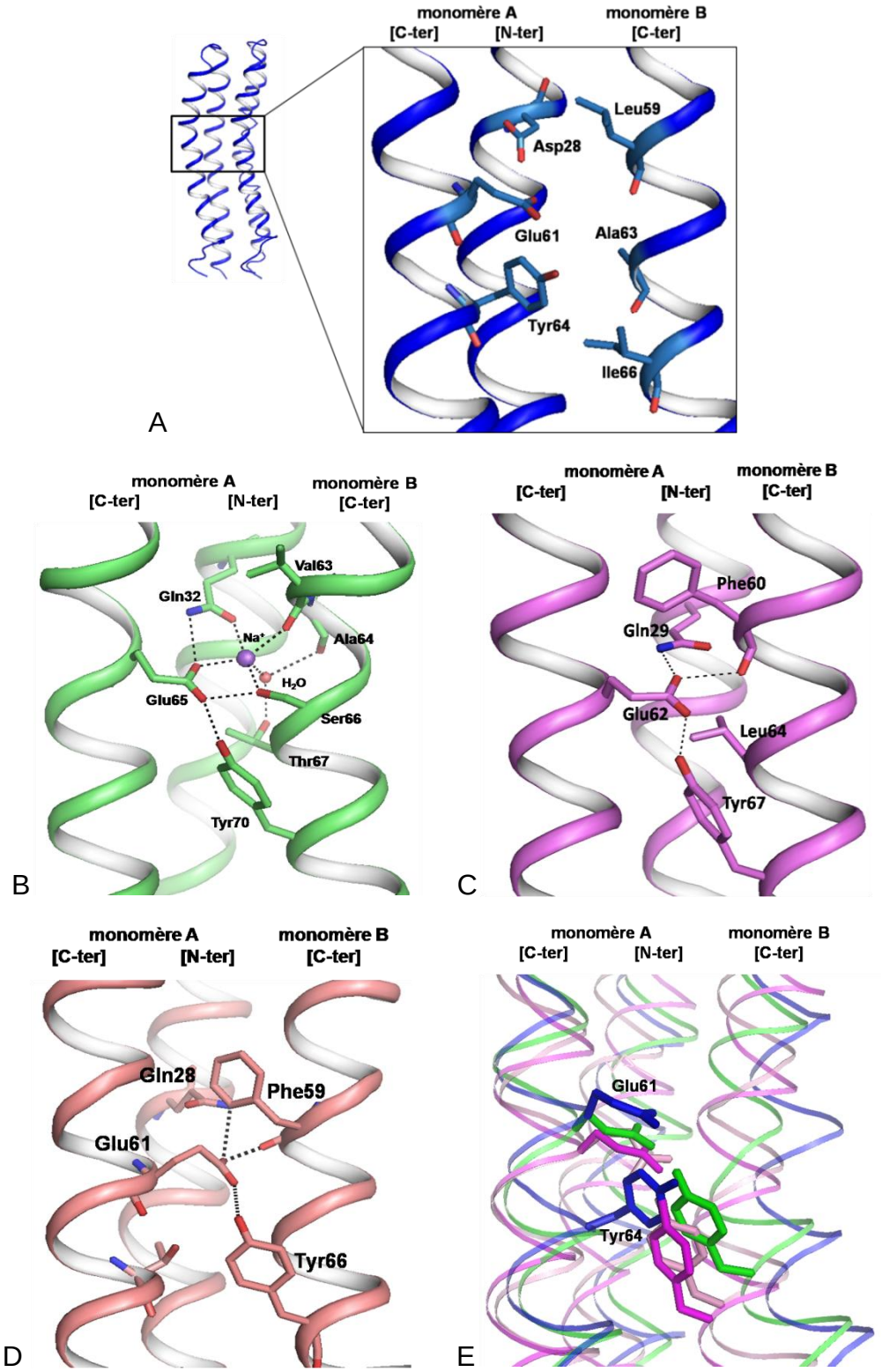


Figure 57. (A) Représentation en cartoon de la région contenant le résidu Glu61 dans notre modèle de l'anneau c de *M. tuberculosis*. Les acides aminés impliqués dans la résistance au TMC207 et la Tyr64 sont visibles en représentation stick. (B-C-D) site de fixation de l'ion H+ ou Na+ dans l'ATP synthase de (B) *I. tartaricus* (code PDB 2WGM), (C) *S. platensis* (code PDB 2WIE), (D) chloroplaste (code PDB 2W5J). (E) Superposition des structures de deux monomères c de *S. platensis* (en fuchsia), *I. tartaricus* (vert), chloroplaste (en rose) et du modèle de *M. tuberculosis* (en bleu).

6. Docking du TMC207 dans le modèle de l'anneau de sous-unités c de *M. tuberculosis*

Nous avons utilisé le modèle d'anneau c de *M. tuberculosis* pour réaliser les expériences de docking du TMC207. La boîte utilisée pour le docking a été centrée sur la région englobant le Glu61 (cube de 40X40X40 $Å^3$). Les solutions obtenues ont été clusterisées en fonction de leur écart quadratique moyen. La meilleur solution a été extraite du cluster contenant le plus grand nombre de solutions et ayant l'énergie de liaison calculée la plus faible (-8.89 kcal/mol) (Figure 58).

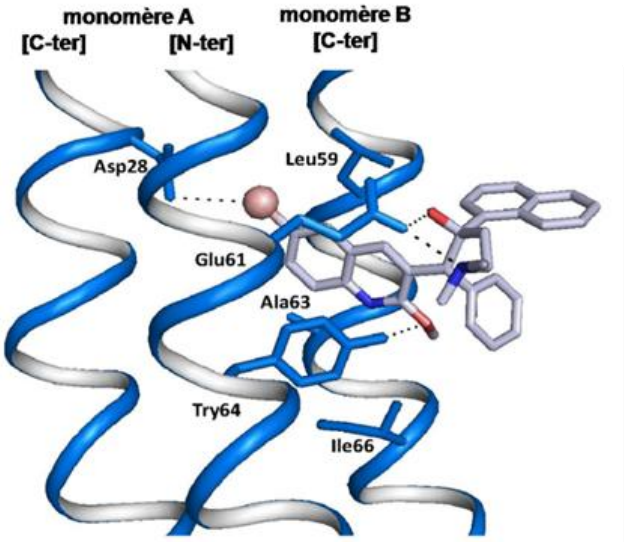


Figure 58. Docking du TMC207 dans le modèle d'anneau c de *M. tuberculosis*.

L'analyse de cette solution indique que le TMC207 serait ancré via son groupement quinoléine dans la poche délimitée par Asp28, Glu61 et Tyr64 d'un côté (portés par le monomère A, Figure 58) et Leu59, Ala63 et Ile66 de l'autre côté (portés par le monomère B, Figure 58), la drogue étant stabilisée par trois types d'interactions : (i) une liaison hydrogène et un pont salin liant le Glu61 au TMC207 respectivement au niveau des groupements hydroxyle et diméthylamino de la drogue, (ii) une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle de Tyr64 et le groupement oxyméthyle de la drogue et (iii) une liaison halogène entre l'atome de brome électronégatif du TMC207 et l'Asp28 au fond de la poche (Figure 58). Dans

cette conformation, les groupements naphtyle et phényle pointent à l'extérieur de l'anneau et vont pouvoir ainsi stabiliser la fixation grâce à des interactions hydrophobes avec la bicouche lipidique entourant l'anneau.

EXPRESSION ET PURIFICATION DE LA SOUS-UNITE C DE L'ATP SYNTHASE MYCOBACTERIENNE

1. Les protéines membranaires

Il existe deux types de protéines membranaires selon leur localisation fine au niveau de la membrane : les protéines intrinsèques (intégrées dans la membrane) et protéines extrinsèques (associées à la membrane). Les protéines intrinsèques sont divisées en deux classes : ancrées à la membrane et transmembranaires. On trouve parmi les protéines transmembranaires trois grands types de structures : celles qui comportent une seule hélice α, celles qui comportent plusieurs hélices α et celles qui constituent un tonneau β (Figure 59). La sous-unité c de l'ATP synthase est une protéine membranaire intrinsèque, transmembranaire, composée de plusieurs hélices α.

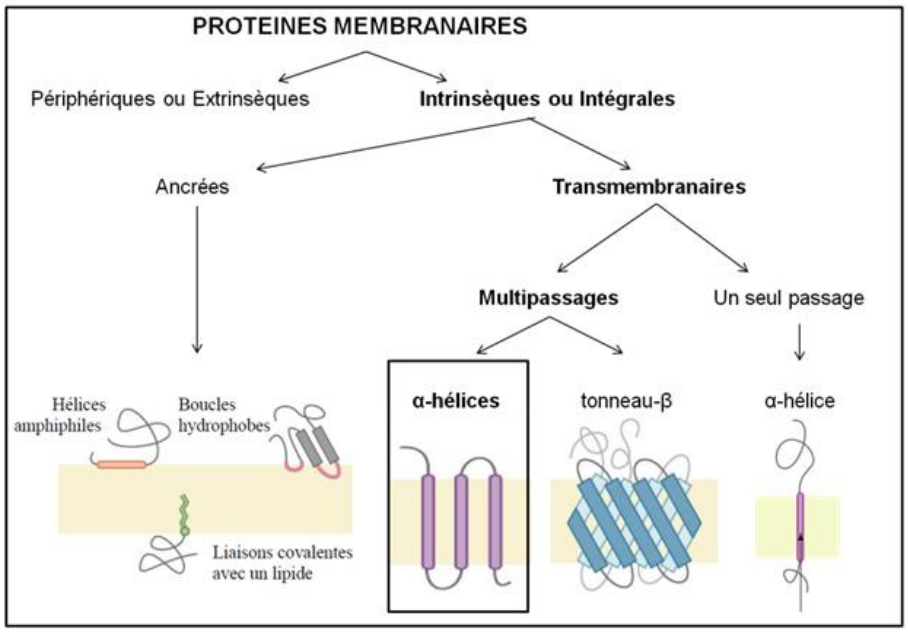


Figure 59. Classification des protéines membranaires

Les protéines membranaires jouent un rôle fondamental dans les processus biologiques, comme le transport de molécules, la signalisation et la structure de la cellule. Environ 30% des gènes chromosomiques codent pour des protéines membranaires. Malgré leur importance, leur structure et leur fonctionnement sont encore peu caractérisés, et elles représentent seulement 1% des structures 3D résolues déposées dans la PDB (http://www.pdb.org).

Les protéines membranaires sont naturellement insérées dans l'environnement lipidique de la membrane biologique. Afin de les purifier, il faut les extraire de la bicouche lipidique pour pouvoir les analyser dans un environnement aqueux. La solubilisation des protéines membranaires se fait grâce à l'utilisation de détergents qui forment des complexes stables avec les lipides et les protéines. D'une manière générale, les protéines membranaires sont difficiles à manipuler, souvent produites en quantité très faible dans la cellule, et leur surexpression hétérologue est compliquée, voire même impossible (problème de folding, de toxicité cellulaire…).

2. Les détergents

Le challenge le plus important dans la purification des protéines membranaires est le choix du détergent à utiliser lors de l'extraction de la membrane et de la purification. Le détergent est une molécule amphipatique qui contient un groupe polaire et une chaîne hydrocarbonée hydrophobe. Dans l'eau, les groupes polaires peuvent former des liaisons hydrogènes avec l'eau, et les chaînes hydrocarbonées font des interactions hydrophobes entre elles et forment des structures organisées appelées micelles (Figure 60).

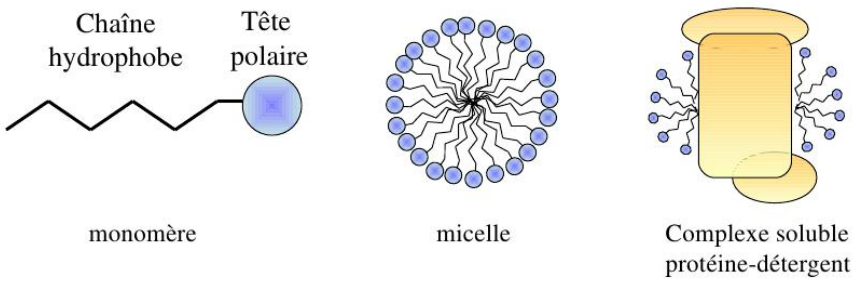


Figure 60. Propriétés des détergents.

Les détergents solubilisent les protéines membranaires en mimant l'environnement de la membrane biologique. A basse concentration, les molécules de détergent lient la membrane en se plaçant entre les phospholipides de membrane. A haute concentration, la membrane se casse et forme des micelles

avec le détergent. Les protéines membranaires sont incorporées dans les micelles avec les résidus hydrophobes entourés de chaînes hydrocarbonées et deviennent solubles dans l'eau (Figure 61).

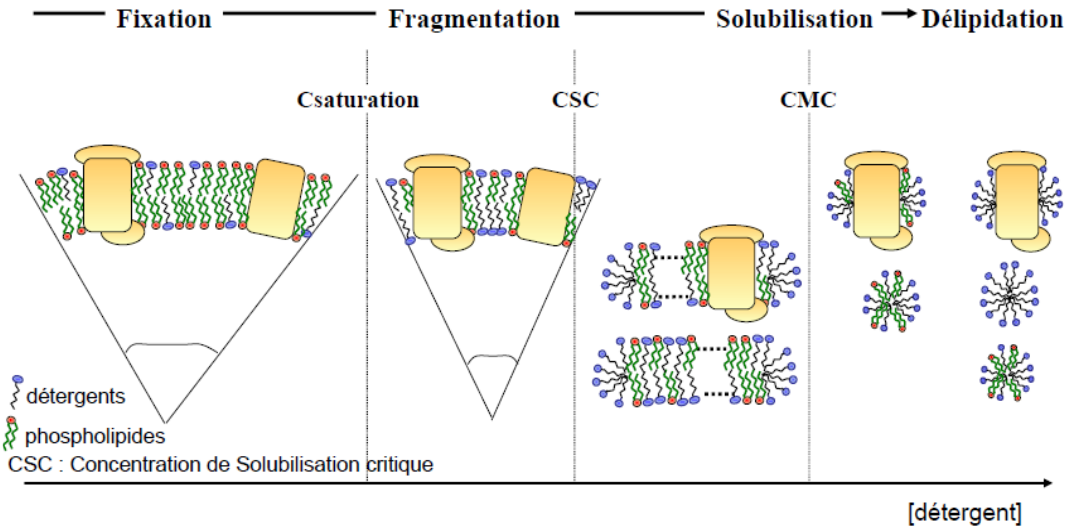


Figure 61. Schéma de l'extraction d'une protéine de la membrane par un détergent. La concentration du détergent augmente de la gauche vers la droite, conduisant à la solubilisation des protéines. Csaturation : concentration de saturation, CSC : concentration de solubilisation critique, CMC : concentration micellaire critique.

Il existe plusieurs types de détergents. Sur la base de la nature du groupe polaire, ils peuvent être classés en trois catégories : ioniques (cationiques ou anioniques), non-ioniques et zwitterioniques (Tableau 13). Chaque détergent est caractérisé par :

- la CMC (Concentration Micellaire Critique) : la plus basse concentration à laquelle les monomères de détergent peuvent former des micelles ;
- le point trouble : la température au-dessous de laquelle les détergents non-ioniques se séparent en une phase riche en détergent et une phase pauvre en détergent ;
- le nombre d'agrégation : le nombre de monomères de détergent présent dans une micelle ;
- la Balance Hydrophile-Lipophile (HLB) : plus la HLB est grande, plus le détergent est hydrophile. Les détergents avec une HLB comprise entre 12 et 20 sont les détergents les plus efficaces pour la solubilisation non-dénaturante des protéines membranaires.

Detergent	Type	M_r	CMC (m*M*)	*n*	HLB	Cloud point (°C)
Polyoxyethylene detergents						
$C_{12}E_8$	N	540	<0.1	120	13.1	
Genapol X-080 (i-$C_{13}E_8$)	N	553	~0.1		13.0	75
$C_{12}E_9$ (Thesit)	N	583	<0.1	120	13.6	79
Brij 35 ($C_{12}E_{23}$)	N	1200	<0.1	40	16.9	
Triton X-100 (i-$C_8\phi E_{9.5}$)	N	625	0.3	140	13.5	65
Triton X-114 (*i*-$C_8\phi E_{7.5}$)	N	537	0.35		12.4	22
Tween 20	N	1228	0.06		16.7	
Tween 80	N	1310	0.01	58	15.0	
Glycoside detergents						
Octyglucoside	N	292	15	30–100		
Decylglucoside	N	320	~2			
Octylthioglucoside	N	308	4–9			
Decyl-β-D-maltoside	N	483	~0.2	98		
Dodecyl-β-D-maltoside	N	511	~0.2	98		
Tetradecyl-β-D-maltoside	N	538	0.012			
n-Decylsucrose	N	496	2.5			
n-Dodecylsucrose	N	524	0.3			
Nonanoyl-*N*-methylglucamide	N	333	~15			
Decanoyl-*N*-methylglucamide	N	348	~5			
BigCHAP	N	878	3.4	10		
Zwitterionic detergents						
CHAPS	Z	615	3–10	4–14		
CHAPSO	Z	631	4–8			
Sulfobetain SB 3-12	Z	336	3.6	55		
Sulfobetain SB 3-14	Z	364	0.33	83		
LDAO [C_{12}—$N^+(CH_3)_2$—O^-]	(Z)	229	~1	76		
Bile salts						
Cholate (Na^+, pH > 8)	–	399	~10	2–5		
Deoxycholate (Na^+, pH > 8)	–	415	~2	~10		
Taurocholate (Na^+, pH > 8)	–	538	<10	4		
Taurodeoxycholate (Na^+)	–	522	~2	>6		
Ionic detergents						
SDS	–	288	<10	60–100		
CTAB [C_{16}—$N^+(CH_3)_3$]	+	365	1.0	170		

Tableau 13. Les détergents les plus communs avec leur charge (+ positif, - négatif, z zwitterion, N neutre), la masse d'un monomère (M_r), l'aggregation number (n), l'HLB et le cloud point.

Le choix du détergent est une étape cruciale dans la purification d'une protéine membranaire et, même si on dispose de protocoles déjà publiés, il ne peut être fait qu'après de nombreux tests expérimentaux. En effet un détergent qui est adapté à la purification d'une protéine peut ne pas être adapté à une protéine qui lui est homologue chez un autre organisme ou pour d'autres protéines chez le même organisme. Différents screenings doivent donc être faits afin de définir le meilleur détergent pour l'extraction de la protéine de la membrane, le meilleur détergent pour les étapes de purification et le meilleur détergent pour la cristallisation.

Les détergents inclus dans nos différents screening ont été choisis en fonction de leur caractéristiques intrinsèques mais également en fonction de leur capacité à solubiliser et purifier les protéines membranaires des mycobactéries et à solubiliser et purifier l'ATP synthase d'autres organisme :

Détergents polyoxyéthylenique

- **Triton X100**, CMC 0.03% : utilisé pour la purification de l'ATP synthase de *Thermus thermophilus* (Yokoyama, Nagata et al. 2003), de *I. tartaricus* (Neumann, Matthey et al. 1998) et de *Bacillus* sp. strain TA2.A1 (Cook, Keis et al. 2003).
- **Triton X114**, CMC 0.01% : utilisé pour la solubilisation de protéines membranaires mycobactérienens et, entre autres, la sous-unité a de l'ATP synthase, de *M. bovis* BCG (Malen, Berven et al. 2008) et de *M. tuberculosis* (Lee, Hefta et al. 1992).
- **Tween 20**, CMC 0.007% : utilisé pour la purification de l'ATP synthase de la bactérie thermophile PS3 (Hazard and Montemagno 2002).
- **Tween 80**, CMC 0.0016% : utilisé pour la solubilisation de protéines membranaires (Madden and Cullis 1984; Unger, Hargrave et al. 1997)

Détergents glycosidiques

- **N-Lauroylsarcosine,** CMC 0.19% : utilisé pour la solubilisation de protéines membranaires (Beis, Nesper et al. 2004). A une concentration de 1% il déstabilise l'ATP synthase de *C. paradoxum* (Ferguson, Keis et al. 2006) et *I. tartaricus* (Meier, Polzer et al. 2005) en séparant les deux domaines.
- **N-Tridecyl-β-D-Maltopyranoside** (TriDM), CMC 0.0017% : utilisé pour la purification et la solubilisation de protéines membranaires (Jaroslawski, Zadek et al. 2007; Wang, Politis et al. 2010).
- **N-Dodecyl-β-D-Maltopyranoside** (DDM), CMC 0.009% : Utilisé pour la purification de l'ATP synthase de la bactérie thermophile PS3 (Hazard and Montemagno 2002), de *Thermus thermophilus* (Bernal and Stock 2004), de *Bacillus* sp. strain TA2.A1 (Meier, Morgner et al. 2007), de *S. cerevisiae* (Stock, Leslie et al. 1999), de *B. pseudofirmus* OF4 (Preiss, Yildiz et al. 2010) et du chloroplaste (Vollmar, Schlieper et al. 2009).

Détergent zwitterioniques

- **Zwittergent 3-12**, CMC 0.13% :utilisé pour la solubilisation de plusieurs protéines membranaires de *M. smegmatis* (Heinz and Niederweis 2000) et la purification d'une porine de *M. smegmatis* (Mukhopadhyay, Basu et al. 1997).

Pour les tests de solubilisation, d'une manière générale nous avons utilisé le détergent à une concentration équivalente à 100 fois sa CMC. Pour les tests de purification, le détergent à été utilisé à 2 fois sa CMC.

Un détergent ionique, le SDS, a également été utilisé lors des tests d'expression.

3. Expression et purification de la sous-unité c de *M. tuberculosis*

Une des méthodes les plus efficaces pour la surexpression d'une protéine d'intérêt est sa surexpression hétérologue chez *E. coli.* Mais il peut exister des problèmes de toxicité, surtout quand la protéine surexprimée est une protéine membranaire. Pour augmenter nos chances de réussite, nous avons non seulement essayé de surexprimer la sous-unité c de l'ATP synthase de *M. tuberculosis* chez *E. coli* via différents vecteurs d'expression et dans différentes souches réceptrices, mais nous avons également fait des tests de production *in vitro* de la protéine, le système de production de protéines *in vitro* ayant déjà donné de bons résultats pour la production de la sous-unité b de l'ATP synthase de *E. coli* (Lian, Ma et al. 2009). Les deux méthodes ont été testées en parallèle en utilisant les mêmes constructions plasmidiques, c'est-à-dire les constructions permettant la surexpression de la sous-unité c de *M. tuberculosis* sans tag (plasmide pET29atpEBK), avec un His-tag en C-ter (plasmide pET29atpEBK6H) et en fusion avec la Maltose Binding Protein (MBP) (plasmide pMALc2).

Expression *in vitro*

Pour les tests d'expression *in vitro*, deux détergents ont été utilisés afin de solubiliser la protéine, le SDS et le Triton X100. Malheureusement, la protéine n'a jamais été visible sur gel SDS-PAGE, ni détectable sur Western Blot, indépendamment du plasmide de départ ou du détergent utilisé.

Expression chez *E. coli*

Pour les tentatives de surexpression chez *E. coli,* en plus des constructions citées ci-dessus, nous avons également testé l'expression de la sous-unité c avec un His-Tag en N-terminal (plasmide pET28atpEBK6H), un tag en C-terminal (plasmide pTBSG/Rv1305) (Qin, Hu et al. 2008), et en protéine de fusion avec la MBP (plasmide pTBMAL/Rv1305). Quatre souches différentes de *E. coli,* BL21, BL21 Codon Plus, C43 et C44, ont été testées. L'ensemble des tests est récapitulé dans l'annexe 3.

Si on exclue la protéine de fusion avec la MBP, l'expression de la sous-unité c de *M. tuberculosis* chez *E. coli* avec ou sans His-Tag n'a pas, semble-t-il, permis la production de la protéine, qui n'était pas visible sur gel SDS-PAGE ni détectable sur Western Blot. Malgré les différentes constructions, les tentatives de variation de la température, du temps d'induction et surtout de la souche de *E. coli*, aucune production n'a pu être obtenue.

A l'inverse, l'expression de la sous-unité c de *M. tuberculosis* sous forme de protéine de fusion avec la MBP a permis la production de la protéine chez *E. coli* BL21 Codon Plus. Cette technique d'expression a déjà été utilisée avec succès pour la production chez *E. coli* de plusieurs protéines membranaires de *M. tuberculosis* (Korepanova, Moore et al. 2007). La construction plasmidique pMALc2 permet la production de la sous-unité c en fusion avec la MBP avec un His-Tag en C-terminal de la MBP (protéine MBP-His-su*c*), alors que la construction plasmidique PTBMAL/Rv1305 permet la production d'une sous-unité c - MBP avec un His-Tag en N-terminal de la MBP (protéine His-MBP-su*c*). Les deux protéines recombinantes se caractérisent par une masse moléculaire théorique d'environ 51 kDa (MBP 42.5 kDa, sous-unité c 8 kDa) et il est possible de les purifier sur résine de nickel ou sur résine d'amylose.

Dans la pratique, nous avons obtenu des résultats identiques pour l'expression et la purification des protéines MBP-His-su*c* et His-MBP-su*c* :

- quel que soit la méthode de lyse cellulaire employée : sonication ou Presse de French ;
- que la purification soit faite sur résine de nickel ou d'amylose ;
- quel que soit le détergent et la concentration à laquelle il a été utilisé : DDM 0.02%, DDM 0.04%, TriDM 0.005%.

Le profil de migration sur gel SDS-PAGE des fractions purifiées à partir des protéines solubles et membranaires (surnageants S2 et S3 de l'annexe 2) est identique, la protéine majoritaire étant celle correspondant à la protéine de fusion à la masse moléculaire attendue de 51 kDa (Figure 62). Sur le gel (Figure 62), nous observons également une bande correspondant à une protéine de masse moléculaire d'environ 43 kDa, qui serait la MBP endogène de *E. coli* copurifiée sur résine d'amylose, ainsi que plusieurs bandes de haut poids moléculaire. Ces bandes de haut poids moléculaire disparaissent lors d'un traitement des fractions à l'urée 7 M, qui va dénaturer tous les complexes protéiques contenant des interactions hydrophobes fortes. Ces bandes doivent donc correspondre à des multimères de MBP-His-su*c* interagissant entre eux via la sous-unité c (schéma Figure 62). Sur le gel de la Figure 62, nous voyons que la MBP-His-su*c* est plus abondante dans la fraction correspondant aux protéines solubles (piste 1) que dans celle correspondant aux protéines membranaires (piste 3). Nous avons obtenu le même profil de migration sur gel SDS-PAGE pour la protéine de fusion His-MBP-su*c* purifiée.

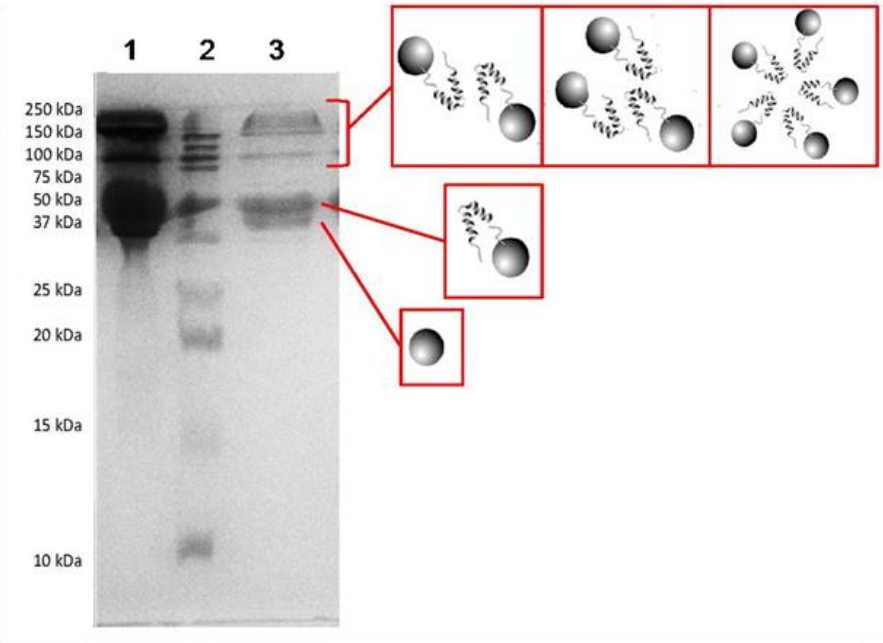


Figure 62. Gel SDS-PAGE 12% de l'élutions après purification sur résine d'amylose de la protéine de fusion MBP-His-su*c* (1) Purification de la fraction contenant les protéines solubles (S2), (2) marqueur de poids moléculaire, (3) purification des protéines membranaires solubilisés en DDM (S3). Les carrés rouges indiquent à quel complexe protéique correspondent les protéines visibles sur gel : MBP seul, MBP-sous-unité c, dimère–trimère-pentamère… de MBP-His-su*c* (trois formes multimériques sont représentées mais il peut exister d'autres types de multimère). Les protéines visibles sur gel SDS-PAGE ont été identifiées par analyse en spectrométrie de masse.

On peut noter ici qu'une différence significative du rendement de la purification a été observée en fonction du détergent utilisé. Les purifications faites en utilisant les détergents DDM et TriDM ont permis de récupérer une quantité plus abondante de protéine par rapport à la purification avec le N-Lauroylsarcosine (entre 6 et 7.5 mg/ml de protéine pour les deux premiers et seulement 0.5 à 1 mg/ml pour le dernier)

Des tests de digestion pour séparer la sous-unité c de la MBP ont été faits à partir des deux protéines de fusion MBP-His-suc et His-MBP-suc. La protéine MBP-His-suc possède un site de coupure à la thrombine entre la MBP et la sous-unité c. La digestion avec la thrombine permet la coupure de la protéine de fusion, comme cela est visible sur gel SDS-PAGE (Figure 63). Après une heure de coupure, la protéine à 51 kDa (MBP-sous-unité c) disparait et la protéine d'environ 43 kDa (MBP seule) devient plus abondante ; plusieurs autres bandes de petites poids moléculaire apparaissent (Figure 63A). Le profil de la digestion ne change pas en fonction du détergent utilisé (Figure 63A). De même, après une digestion de 16 heures, les bandes de haut poids moléculaire correspondant aux complexes MBP-sous-unité c ne sont plus visibles sur gel SDS-PAGE (Figure 63B). Toutes les bandes de petit poids moléculaire visibles sur gel SDS-PAGE obtenues après digestion ont été analysées en spectrométrie de masse, mais la sous-unité c n'a jamais pu être détectée.

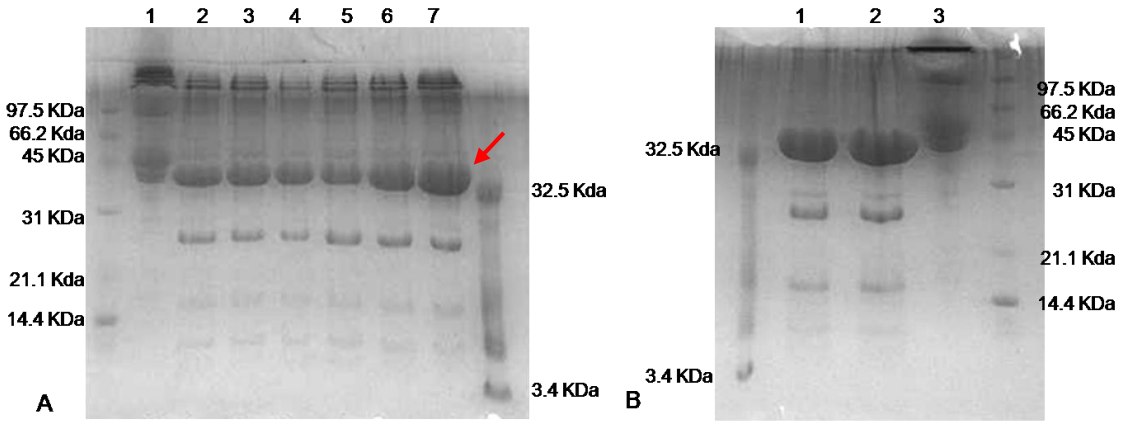


Figure 63. Gel SDS-PAGE à 16% d'acrylamide de la digestion de la protéine de fusion MBP-His-suc par la thrombine. (A) (1) Protéine non digérée, (2-3-4) protéine digérée respectivement pendant 1h, 2h et 4h dans un tampon avec du Triton X100 0.1%, (5-6-7) protéine digérée respectivement 1h, 2h et 4h dans un tampon avec du DDM 0.02%. La flèche rouge indique la bande correspondant à la MBP digérée. (B) Protéine digérée 16 heures dans un tampon avec du (1) DDM ou du (2) Triton X100, (3) protéine non digérée.

La protéine de fusion His-MBP-su*c* possède un site de coupure à la protéase TEV entre la MBP et la sous-unité c. Le profil de digestion de la protéine sur gel SDS-PAGE est le même que pour la digestion à la thrombine (non montré) et la sous-unité c n'a pas pu être détectée parmi les protéines visibles sur gel analysées en spectrométrie de masse. L'utilisation de détergents différents n'a pas permis d'améliorer ce résultat.

La protéine MBP-His-su*c* purifiée a été utilisée pour des tests de cristallisation. Il a été montré que s'il existe des problèmes de coupure entre la MBP et la protéine d'intérêt, la protéine de fusion complète peut, dans certains cas, être cristallisée avec succès et permettre l'obtention de la structure (Smyth, Mrozkiewicz et al. 2003). Afin d'améliorer la purification de la protéine de fusion MBP-His-su*c*, les fractions d'élution de la résine d'amylose ont été concentrées et purifiées sur une colonne de chromatographie d'exclusion de taille afin de séparer la MBP-His-su*c* de la MBP endogène de *E. coli* (Figure 64).

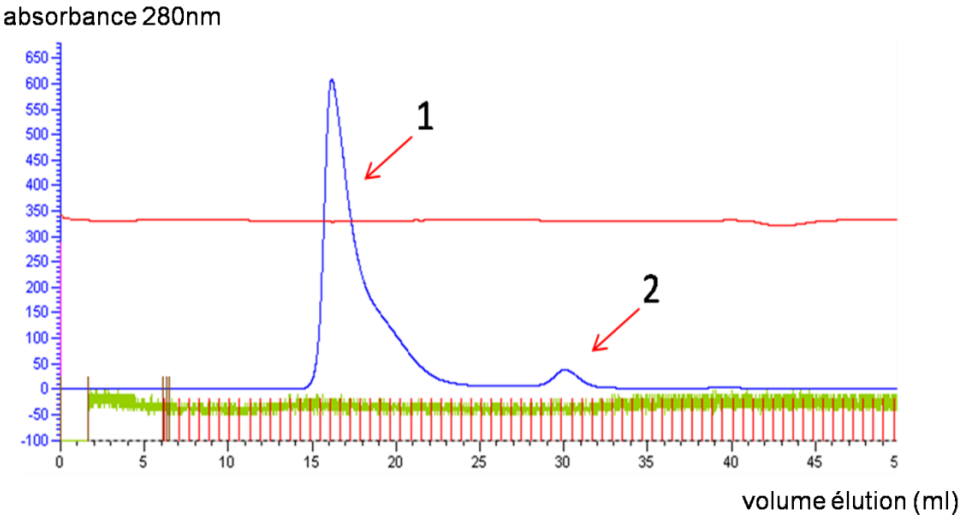


Figure 64. Chromatographie de la purification sur résine d'amylose de la protéine MBP-His-su*c*. Le pic 1 correspond à la protéine de fusion, le pic 2 à la MBP endogène de *E. coli*.

Les tests de cristallisation effectués avec la protéine de fusion ont permis d'obtenir des cristaux dans la condition I du kit Crystal Screen I (0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol) (Figure 65). Les clichés de diffraction aux rayons X obtenus à partir des cristaux montrent quelques tâches à très basse résolution. Malgré de nombreuses tentatives ces cristaux n'ont pas encore pu être reproduits.



Figure 65. Cristaux obtenus avec la condition I du kit Crystal Screen I (0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 30% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol).

4. Expression et purification de l'ATP synthase de *M. smegmatis* : premières analyses en microscopie électronique

En parallèle de l'approche par expression hétérologue de la sous-unité c de l'ATP synthase de *M. tuberculosis* chez *E. coli*, nous avons mis au point un protocole d'expression homologue et de purification de la sous-unité c de *M. smegmatis* chez *M. smegmatis*. Nous avons choisi ce modèle d'étude pour 2 raisons : (i) une expression homologue permet d'éviter les problèmes de toxicité liées à une expression hétérologue et (ii) *M. smegmatis* est une mycobactérie non pathogène à croissance rapide (temps de doublement de 2-3 heures).

Plusieurs constructions plasmidiques ont été faites et testées afin de faciliter cette purification. Les deux constructions, pLYGatpEsme et pLYGatpEmse6H (cartes en annexe 1), permettent la production de la sous-unité c de *M. smegmatis*, augmentant ainsi la quantité de la protéine dans la bactérie, respectivement sans et avec un His-Tag en N-terminal. Une troisième construction, pLYGatpDsme6H (carte en annexe 1), permet la production de la sous-unité β de l'ATP synthase de *M. smegmatis* avec un His-Tag en C-terminal.

Purification de la sous-unité c sans tag

Pour la purification de la sous-unité c sans tag, le protocole de purification de l'anneau c de *I. tartaricus* a été utilisé (Neumann, Matthey et al. 1998). Le protocole consiste en la solubilisation des protéines membranaires avec du Triton

X100 1% (surnageant S2, annexe 2) et à la récupération de l'ATP synthase avec une précipitation différentielle au PEG 6000. Les fractions obtenues ont été déposées sur gel SDS-PAGE (Figure 66).

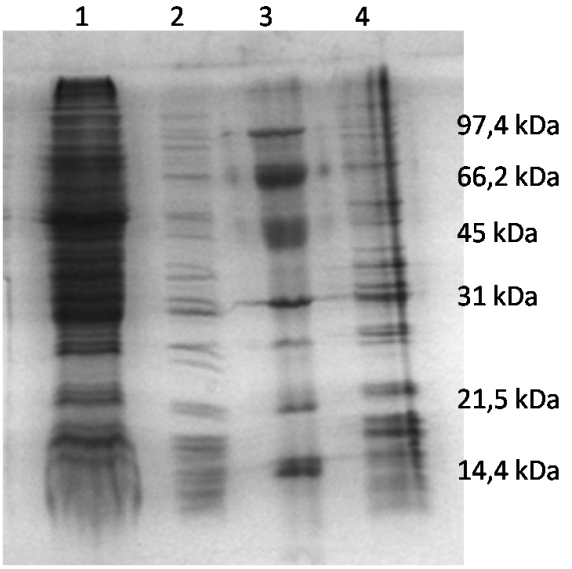


Figure 66. Gel 14% de la purification de la sous-unité c de *M. smegmatis* selon le protocole de purification de l'anneau c de *I. tartaricus* (1) protéines non solubles dans du Triton X100 1%. (2) fraction correspondant à l'ATP synthase. (3) marqueur de taille. (4) fraction correspondant à l'ATP synthase précipitée au TCA.

Dans la fraction correspondant théoriquement à l'ATP synthase, nous avons observé sur gel SDS-PAGE plusieurs protéines de poids moléculaire différents (puits 2 Figure 66). Faisant l'hypothèse que certaines des bandes de haut poids moléculaire pourraient correspondre à un multimérisation des sous-unités c, nous avons précipité au TCA cette fraction afin de déstabiliser l'anneau c (le TCA casse les liaisons hydrophobes fortes et permet de précipiter les protéines pour pouvoir les concentrer en les resuspendant dans un volume plus petit) afin de voir si une des bandes de haut poids moléculaire, correspondant à l'anneau c, disparaissait au profit d'une bande de petit poids moléculaire (monomères de sous-unité c). Aucune modification n'a été observée après la précipitation au TCA (puits 4 Figure 66).

Toutes les protéines visibles sur le gel ont été analysées par spectrométrie de masse mais aucune d'entre elles ne correspondait à une des sous-unités de l'ATP synthase.

Purifcation de la sous-unité c avec un His-Tag

Afin de faciliter la purification de la sous-unité c et son identification, un His-Tag a été introduit en C-terminal de la protéine. Cette méthode a été utilisée au préalable pour purifier l'anneau c de l'ATP synthase de *E. coli* (Tomashek, Poposki et al. 2001). Les cultures ont été cultivées à 30°C ou 37°C et 7 détergents différents ont été testés afin d'extraire la sous-unité c de la membrane : Triton X100, Triton X114, DDM, Zwittergent 3-12, N-Lauroylsarcosine, Tween 20 et Tween 80.

La purification des protéines membranaires solubilisées (S3 et S4, annexe 2) avec du Triton X100 ou du DDM a été faite sur résine de nickel. Nous avons testé trois détergents différents pour la purification : Triton X100, DDM et Zwittergent 3-12. Toutes les fractions de purification obtenues ont été analysées sur gel SDS-PAGE, par Western Blot avec des anticorps anti-His-Tag et par spectrométrie de masse. Dans tous les cas, nous n'avons pas identifié la sous-unité c. Par contre, la purification en présence de Triton X100 à 0.05% après solubilisation des protéines membranaires à partir du culot de débris membranaires (S4) avec du Triton X100 5% a permis l'isolement des sous-unités α et β de l'ATP synthase de *M. smegmatis* en quantité très faible. Nous avons donc formulé l'hypothèse que la sous-unité c était présente mais en quantité trop faible pour pouvoir être détectée.

Pour essayer d'augmenter la quantité de protéine, nous avons travaillé à partir de 40g de cellules, soit 4 fois plus de cellules par rapport aux premiers tests. En utilisant le même protocole de purification un signal très faible en Western Blot avec des anticorps anti-His-Tag a été détecté dans la fraction correspondant aux protéines membranaires solubilisées (S4, annexe 2). La taille de la bande obtenue est comprise entre 75 kDa et 100 kDa (Figure 67), ce qui est plutôt en faveur de la présence de la sous-unité c sous forme d'anneau. Malgré de nombreuses tentatives, nous n'avons pas réussi à améliorer cette purification.

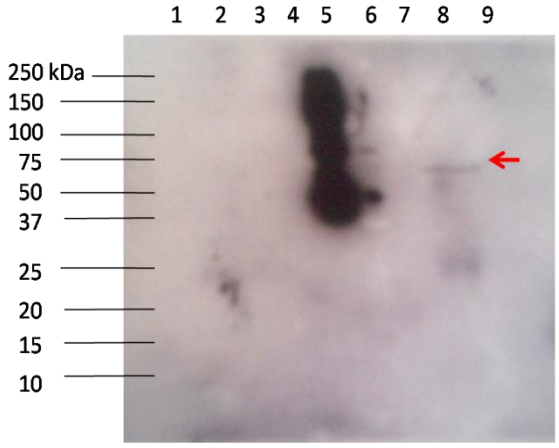


Figure 67. Analyse en Western Blot de l'expression et de la purification de la sous-unité c de *M. smegmatis*. Fractions d'élution de la chromatographie d'affinité sur nickel à partir de C1 (1-2) et C2 (3-4) solubilisés en Triton X100, témoin positif (5), marqueur de taille (6), puits vide (7), C1 (8) et C2 (9) solubilisés en Triton X100.

Purification de la sous-unité β avec un His-Tag et de l'ATP synthase complète

Face à ces difficultés, nous avons mis au point une nouvelle stratégie de purification de l'ATP synthase de *M. smegmatis* en nous inspirant de ce qui a été fait pour purifier l'ATP synthase de *S. cerevisiae* (Rubinstein, Dickson et al. 2005) et de *B. pseudofirmus* OF4 (Preiss, Yildiz et al. 2010) : une construction plasmidique permettant l'expression de la sous-unité β, qui appartient au domaine F_1 soluble, avec un His-Tag en C-terminal a été construite. Cette stratégie permet la récupération d'une ATP synthase complète, incluant l'anneau c.

Plusieurs détergents ont été testés pour l'extraction et la purification : Triton X100, TriDM et DDM. Ces trois détergents ont également été testés pour la purification par chromatographie d'affinité de nickel. Le protocole ayant donné les meilleurs résultats consiste à utiliser le Triton X100 5% pour solubiliser l'ATP synthase (les détails expérimentaux sont schématisé Figure 68) et le DDM 0.02% pour la purification sur colonne de nickel His-TRAP.

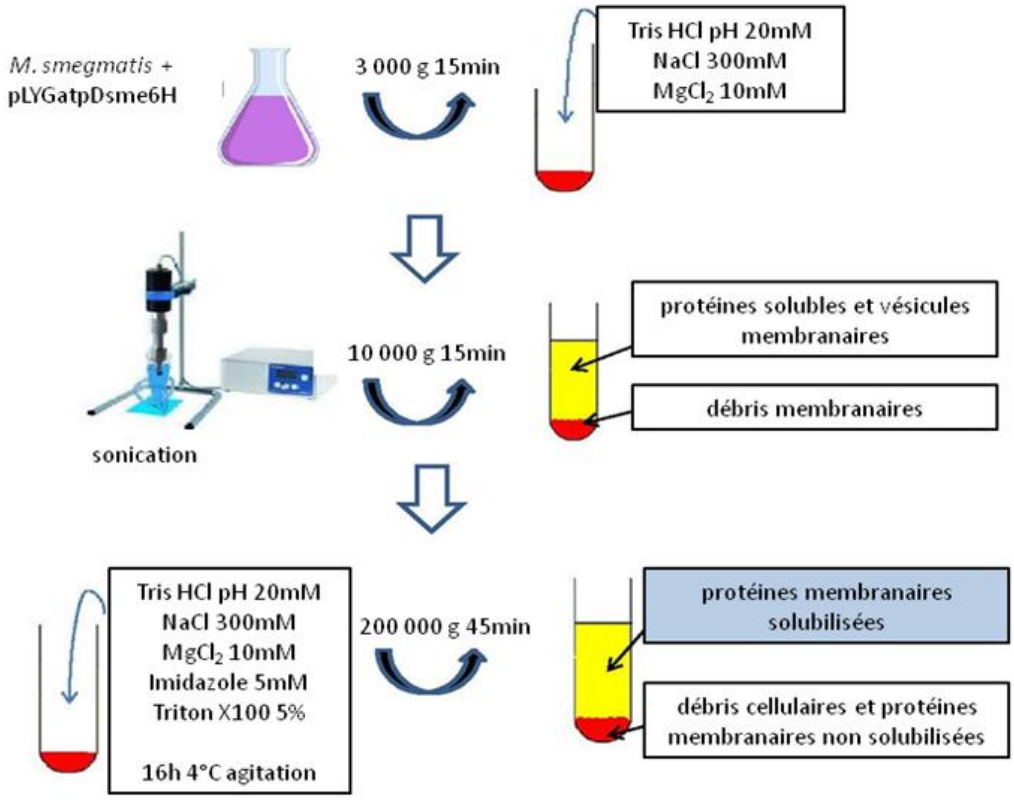


Figure 68. Protocole de solubilisation de l'ATP synthase de *M. smegmatis*.

La Figure 69 montre le profil d'élution chromatographique de la colonne de nickel et la Figure 70 les fractions d'élution. La sous-unité β est majoritairement présente dans les fractions d'élution 17 à 33 (un volume totale de 16 ml) (Figure 70) correspondant à la deuxième partie du pic d'élution de la colonne.

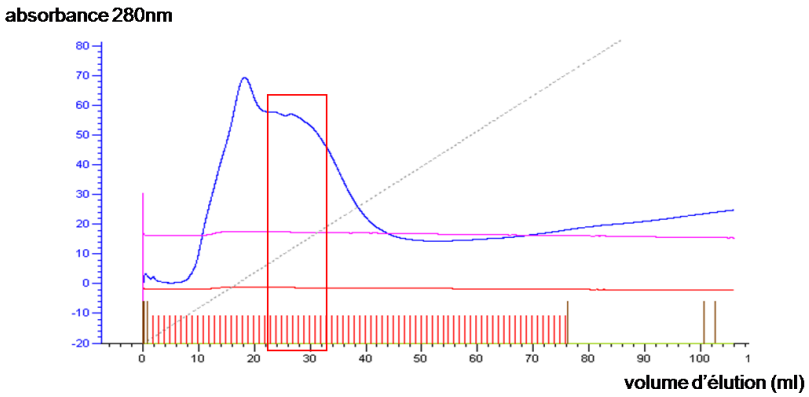


Figure 69. Profil d'élution de l'ATP synthase de *M. smegmatis* en chromatographie d'affinité de nickel. Les fractions contenant la sous-unité β sont encadrées.

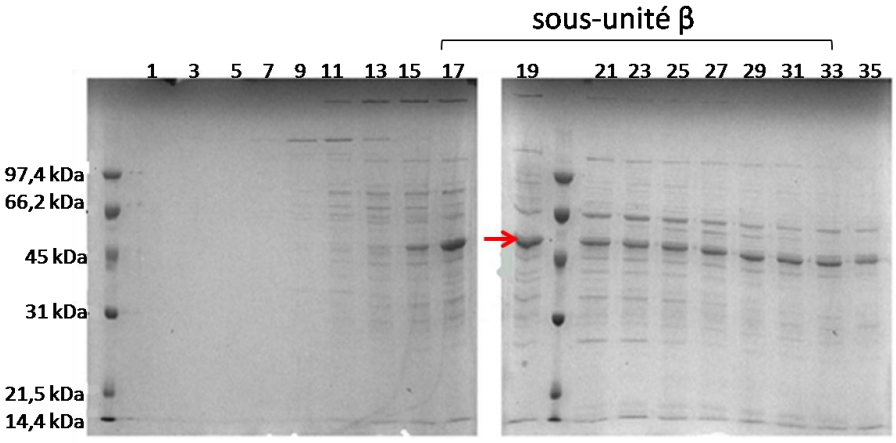


Figure 70. SDS-PAGE 12% de la purification de l'ATP synthase de *M. smegmatis* par chromatographie d'affinité de nickel. Les fractions contenant la sous-unité β sont indiquées. La flèche rouge localise la bande correspondante à la sous-unité β, d'environ 51 kDa.

Les fractions contenant la sous-unité β ont été poolées et concentrées, et une deuxième étape de purification par chromatographie d'exclusion de taille a été réalisée. Sur le chromatogramme de l'élution (Figure 71), la sous-unité β est localisée dans le deuxième pic qui correspond aux fractions 19 à 24.

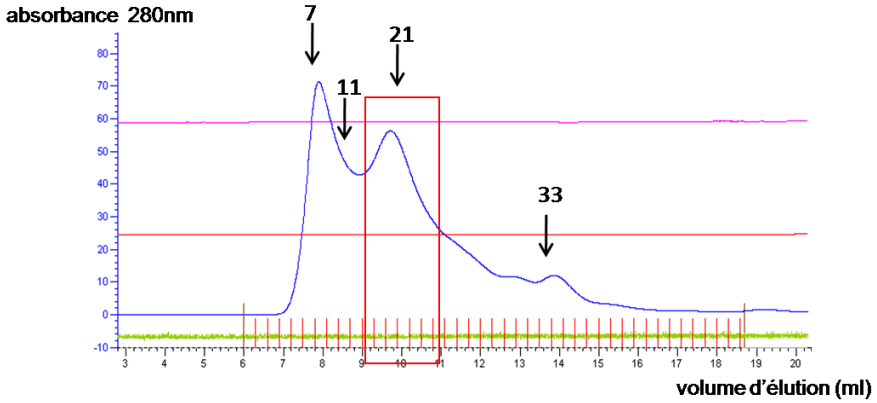


Figure 71. Chromatogramme de la purification de l'ATP synthase de *M. smegmatis* sur colonne Superdex^{TM} 200. Les fractions contenant la sous-unité β sont encadrées. Les flèches noires indiquent les fractions analysées en BN-PAGE.

Ces fractions ont été déposées sur gel SDS-PAGE et sur gel BN-PAGE. Les protéines visibles sur gel SDS-PAGE ont été analysées par spectrométrie de masse et nous avons pu confirmer la présence des sous-unités α (58.8 kDa), β (51.6 kDa), γ (33.3 kDa), δ (47.4 kDa) et ε (13.2 kDa) (Figure 72A). L'intégrité du

domaine F_1 a été vérifiée en condition native BN-PAGE (Blue-Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis) (Figure 72B). Cette technique est particulièrement intéressante dans l'étude de la structure quaternaire des protéines membranaires puisque le colorant utilisé, Bleu de Coomassie G250, permet d'une part de conférer une même densité de charge négative aux protéines sans les dénaturer, d'autre part de solubiliser les protéines membranaires en remplaçant le détergent au cours de la migration. La bande obtenue a une taille d'environ 425 kDa, ce qui correspond à la taille théorique du domaine F_1 complet. Aucune sous-unité du domaine F_O n'a pu être identifiée dans les autres fractions issues de la purification par chromatographie d'exclusion.

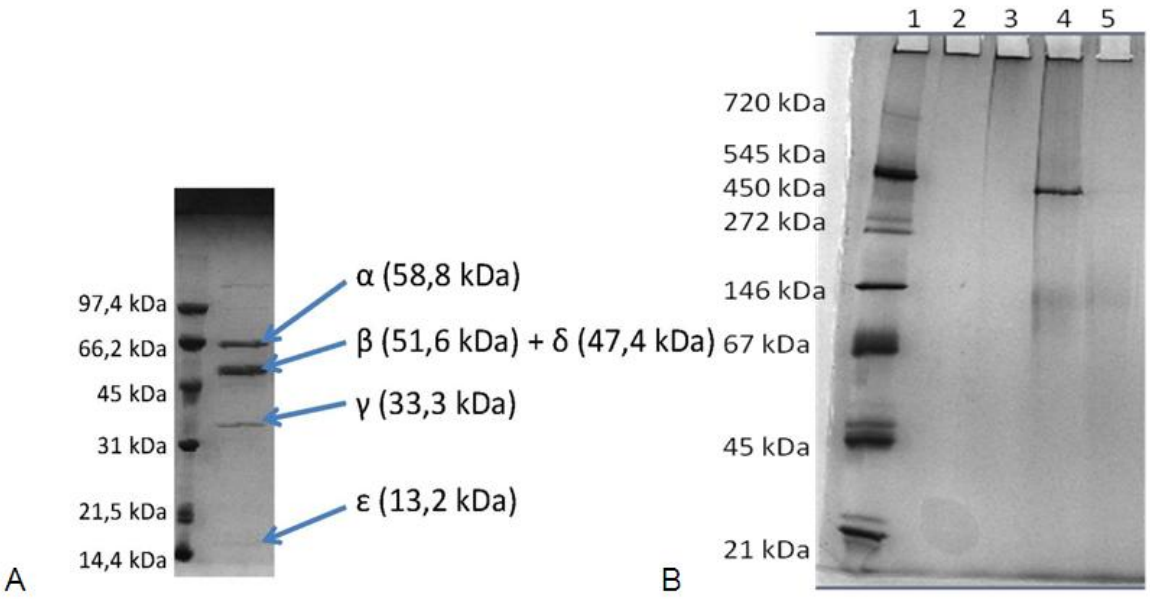


Figure 72. SDS-PAGE 12% et BN-PAGE de l'ATP synthase purifiée de *M. smegmatis*. (A) SDS-PAGE de la fraction contenant la sous-unité β purifiée. Les bandes visibles correspondent aux différentes sous-unités du domaine F_1. (B) BN-PAGE de la fraction contenant la sous-unité β purifiée. (1) Marqueur de taille, (2-3-5) fractions 7, 11 et 33 issues de la purification par exclusion, (4) fraction contenant le domaine F_1 purifié.

Les fractions contenant le domaine F_1 ont été concentrées à 0.58 mg/ml pour réaliser plusieurs screening de cristallisation, qui n'ont pour le moment pas permis l'obtention de cristaux.

Analyse en microscopie électronique

Nous avons entrepris, en collaboration avec l'équipe de Catherine Vénien-Bryan de l'IMPMC (UPMC), l'analyse en microscopie électronique de l'ATP

synthase de *M. smegmatis*. Les échantillons obtenus par coloration négative étaient très homogènes (Figure 73A) pour qu'une première analyse puisse être faite sur 105 images à partir desquelles 247 particules isolées de l'ATP synthase ont été sèlectionnées (Figure 73B). La Figure 73B montre les 16 classes d'images produites, et la Figure 73C la première image d'une ATP synthase mycobactérienne. Sur cette image les deux domaines F_1 et F_O en liaison sont visibles.

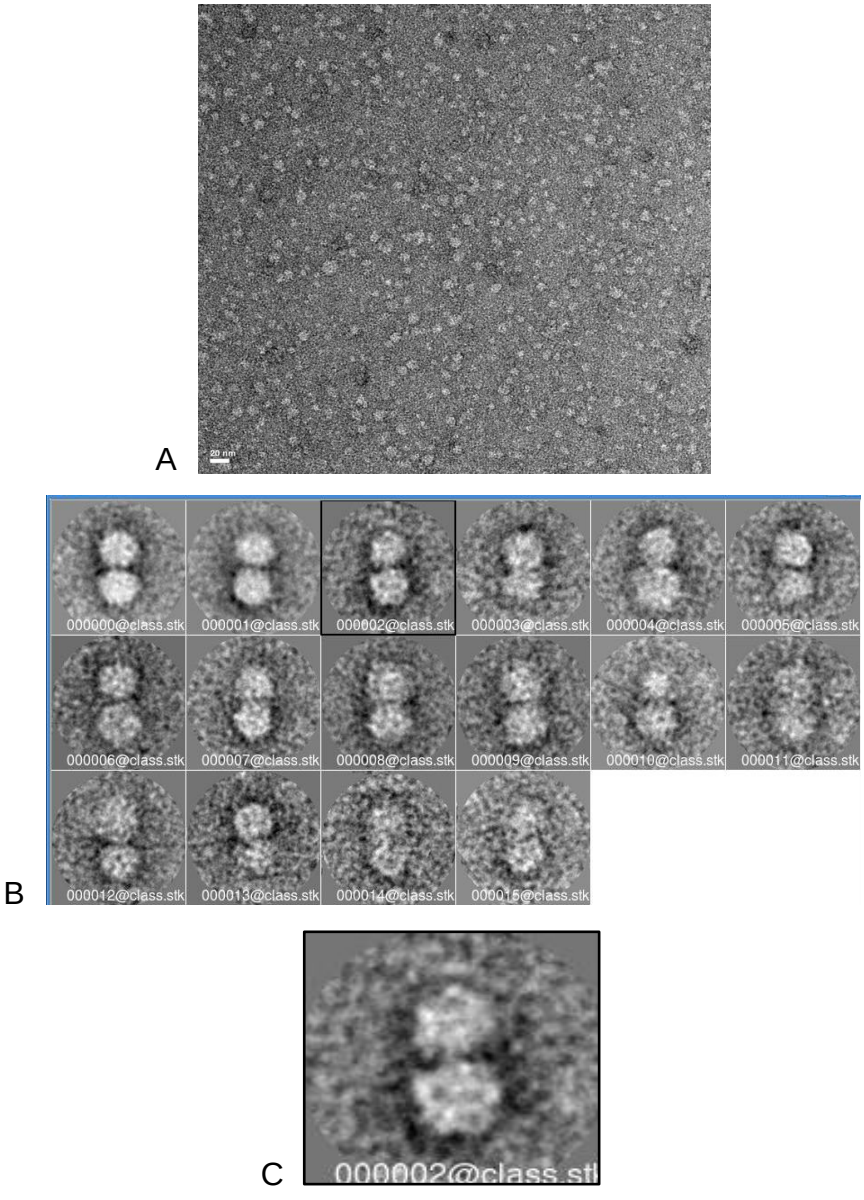


Figure 73. (A) Image en microscopie électronique en coloration négative de l'ATP synthase de *M. smegmatis*. (B) 16 classes produites dans l'analyses de 247 particules isolées. (C) La troisième classe qui représente l'ATP synthase.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons combiné des approches de microbiologie, de biologie moléculaire, de biochimie, et de biologie structurale afin de mieux comprendre le mode d'action exact d'un nouvel antibiotique contre la tuberculose, le TMC207. De nos jours, un tiers de la population mondiale est porteuse de la bactérie *M. tuberculosis,* le pathogène à l'origine de la TB, qui devient de plus en plus résistante aux antibiotiques existants. La mise sur le marché de nouvelles drogues est donc essentielle pour éradiquer la maladie et le TMC207, en phase II de développement clinique, est un nouvel antibiotique très prometteur pour le traitement. Dans ce travail, nous avons poursuivi l'étude de l'interaction entre le TMC207 et sa cible, l'anneau de sous-unités c de l'ATP synthase mycobactérienne, afin de cartographier les interactions entre la molécule et sa cible, d'identifier d'autres mécanismes de résistance à cette drogue et, en parallèle, d'amorcer une étude biochimique et structurale de l'ATP synthase des mycobactéries qui est une nouvelle cible prometteuse chez les mycobactéries.

Dans le but d'étendre nos connaissances sur le site de liaison du TMC207 dans l'ATP synthase, nous avons sélectionné plusieurs mutants, indépendants et spontanés, résistants au TMC207 à partir de quatre espèces mycobactériennes, incluant les pathogènes humains *M. tuberculosis*, *M. fortuitum* et *M. abscessus*. Nous avons choisi de travailler avec 4 souches de *M. tuberculosis (*la souche de référence H37Rv et 3 souches cliniques), avec la souche de référence de *M. smegmatis* mc^2155, avec une souche clinique de *M. fortuitum* et avec une souche clinique *M. abscessus*. Six substitutions différentes dans la sous-unité c ont été caractérisées dans les mutants résistants au TMC207 issus de ces quatre espèces mycobactériennes : D28G/A, L59V, E61D, I66M et A63P (Tableau 8). Quelle que soit l'espèce, le taux de mutation mesuré est très proche, avec des valeurs variant de 10^{-8} à 5.10^{-8}, comparables aux valeurs de l'isoniazide et de la rifampicine (David 1970; Werngren and Hoffner 2003; Johnson, Streicher et al. 2006), deux antituberculeux présentant le taux de mutation le plus bas. Au sein des clones résistants au TMC207 mutés dans la sous-unité c, il existe une variabilité importante du type de mutation dans les 3 souches cliniques de *M. tuberculosis* P, D et LQ (5 substitutions différentes) ainsi que dans la souche clinique V de *M. abscessus* (2 substitutions), par comparaison aux souches de

référence H37Rv et mc^{2}155 et à la souche clinique B de *M. fortuitum* (1 substitution) (Tableau 8). Cette variabilité pourrait être liée à la présence dans les souches d'origine clinique, et plus particulièrement chez *M. tuberculosis*, de mutations dans des enzymes de réparation de l'ADN, favorisant le développement de mutations permettant une adaptation plus facile et plus rapide à l'environnement dans lequel elles doivent survivre (Chang, Lin et al. 2010).

Un résultat inattendu est l'existence, parmi les 82 clones sélectionnés sur TMC207, de 38 clones non mutés dans la sous-unité c, ce qui représente 46% de la totalité des clones. Ces clones ont la particularité d'avoir été sélectionnés sur des concentrations en TMC207 plus faibles que celles qui ont permis la sélection des clones mutés. Nous reviendrons sur l'étude détaillée de ces clones un peu plus loin dans la discussion. Considérant l'hypothèse proposée par De Jonge et coll. (de Jonge, Koymans et al. 2007) selon laquelle le TMC207 pourrait se fixer à l'interface des sous-unités a et c, nous avons séquencé le gène *atpB* (codant pour la sous-unité a) de la totalité des clones résistants et nous n'avons pas identifié de mutation dans ce gène. Ces résultats confirment ceux précédemment obtenus par Huitric et coll. (Huitric, Verhasselt et al. 2010) qui n'ont pas non plus identifié de mutants dans la sous-unité a dans l'ensemble de leurs clones résistants au TMC207. Inversement, pour des drogues comme l'oligomycine et la méfloquine qui bloquent le transfert de protons, respectivement des ATP synthases de la mitochondrie et de *S. pneumoniae,* en interagissant au niveau de l'interface sous-unité a/sous-unité c (John and Nagley 1986; Galanis, Mattoon et al. 1989; Martin-Galiano, Gorgojo et al. 2002), des mutants pour les deux sous-unités ont été identifiés. Si on considère l'ensemble de ces résultats, on peut donc penser que le TMC207 se lie principalement au niveau de l'anneau c (entre deux monomères adjacents), plutôt qu'à l'interface sous-unité c/sous-unité a.

L'effet de chaque substitution sur le niveau de résistance a été évaluée (i) en déterminant la CMI du TMC207 pour les clones résistants et (ii) pour des clones de *M. smegmatis* complémentés avec une sous-unité c mutée (système isogénque). Une première observation dérivée de nos résultats de complémentation génique est l'absence de variation du niveau de résistance au TMC207 des souches de *M. smegmatis* complémentées avec la sous-unité c mutée de *M. tuberculosis* (les CMI des souches complémentées sont identiques à

la CMI mesurée pour la souche sauvage, quel que soit la mutation introduite, Tableau 10). L'identité de séquence primaire des sous-unités c issues des deux espèces étant très élevée (85%), cette absence de complémentation doit être liée aux extrémités N- et C-terminales, respectivement MDPT et V**K** pour *M. tuberculosis,* et M**D**L**D**PNAI et GLQ pour *M. smegmatis,* qui leur sont spécifiques. Ces extrémités devant être importantes pour l'insertion et la stabilisation de l'anneau dans la bicouche lipidique, il est légitime de penser que l'insertion de l'anneau c de *M. tuberculosis* dans la membrane de *M. smegmatis* est défavorable à cause de deux éléments : l'absence de l'extension N-terminale acide spécifique de l'anneau c de *M. smegmatis* et la présence d'un résidu chargé positivement à l'extrémité C-terminale de la sous-unité c de *M. tuberculosis*. Concernant les résultats de complémentation obtenus à partir de la sous-unité c mutées de *M. smegmatis*, ils seront détaillés ci-après, mutation par mutation, conjoitement avec l'interpretation de l'effet des mutations dans la structure 3D de l'anneau c mycobactérien.

Nous avons analysé l'effet de chaque substitution au niveau structural grâce à la modélisation du site de fixation de la drogue dans un modèle d'anneau c mycobactérien. L'analyse du modèle structural obtenu montre que l'organisation du site de fixation du proton incluant le résidu Glu61 et les acides aminés localisés dans son environnement direct, présente une différence majeure par rapport à celui de *S. platensis* au niveau du positionnement de la tyrosine (Tyr67 de *S. platensis,* Tyr64 des mycobactéries) (Figure 57E). Dans l'anneau c de *S. platensis* cette tyrosine est importante dans la stabilisation du proton via la liaison hydrogène qu'elle fait avec le glutamate conservé (Glu62). Fait essentiel, l'absence de cette tyrosine à la même position dans l'ATP synthase mycobactérienne, associée à la présence spécifique de Asp28 et Ala63 chez *M. tuberculosis* à la place respectivement de Gln29 et Leu64 chez *S. platensis*, contribue significativement à élargir l'espace présent au niveau du Glu61 entre deux sous-unités c adjacentes de l'anneau c mycobactérien (Figures 57A et 57C). La présence spécifique de ces résidus chez les mycobactéries permet ainsi de générer une poche suffisamment large pour permettre l'adaptation de la diarylquinoline entre deux sous-unité c adjacentes au niveau du Glu61 (Figure 58). Nous avons confirmé cette hypothèse en modélisant les substitutions Q29D et

L64A dans la structure cristallographique de *S. platensis,* ce qui entraine l'apparition d'une poche dans l'environnement du Glu62 au niveau des deux hélices C-terminales. L'introduction d'une substitution additionelle Y67I dans *S. platensis* (Tyr67 correspondant à Ile66 trové chez *M. tuberculosis*) augmente davantage la taille de cette poche qui s'ouvre alors vers l'extérieur de l'anneau (non montré).

Les résultats de docking réalisé à partir de notre modèle montrent que le groupement quinoléine de la drogue s'accommode dans cette poche spécifique à l'anneau c mycobactérien où il y est stabilisé par trois types d'interactions, (i) une liaison hydrogène et un pont salin liant le Glu61 au TMC207 respectivement au niveau des groupements hydroxyle et diméthylamino de la drogue, (ii) une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle de la Tyr64 et le groupement oxyméthyle de la drogue et (iii) une liaison halogène entre l'atome de brome électronégatif du TMC207 et l'Asp28 localisé au fond de la poche (Figure 58). Des études précédentes ont suggéré que le TMC207 devait interférer dans le transfert de proton en interagissant avec la sous-unité c au niveau du Glu61 (de Jonge, Koymans et al. 2007; Upadhayaya, Vandavasi et al. 2009). Cette hypothèse est confirmée par nos résultats qui montrent une correspondance presque parfaite entre les acides aminés définissant le site de fixation putatif du proton dans l'ATP synthase mycobactérienne et ceux trouvés substitués dans les mutants résistants au TMC207 et qui correspondent à la poche de fixation de la drogue. Ces résidus sont Leu59, Glu61, Ala63 et Ile66 au bord de la poche, et Asp28 au niveau du fond de cette poche. Le fait que la Tyr64 n'ait jamais été trouvée substituée dans les mutants résistants à la drogue est probablement du au fait que ce résidu est important pour l'intégrité et le fonctionnement du site de fixation du proton (interaction probable avec Glu61).

La substitution A63P est celle qui confère le niveau de résistance le plus élevé aux souches de *M. tuberculosis* et *M. abscessus*. La substitution d'une alanine en proline induit une perturbation de la géométrie de l'hélice entre le Glu61 et la Tyr64, perturbation qui doit provoquer une modification structurale empêchant la liaison du TMC207 dans sa poche de fixation. La résistance limitée qu'elle confère dans les tests de complémentation (une augmentation de 4 fois la CMI pour le TMC207, alors que elle était de 133 fois dans les mutants de *M.*

tuberculosis) est probablement liée à une incorporation moins favorable de la sous-unité c mutée par rapport à la sous-unité c sauvage dans l'ATP synthase complète. Cette interférence liée à la compétition entre protéine sauvage (Ala63) et protéine mutée (Pro63) aurait pu être supprimée grâce à l'utilisation d'une souche complémentée, inactivée au niveau de son gène *atpE* chromosomique. Malheuresement toutes nos tentatives pour obtenir une souche inactivée pour le gène *atpE* chromosomique ont échoués. L'importance de la position 63 pour la fixation de la drogue est également soulignée par l'existence de 3 espèces mycobactériennes naturellement résistantes au TMC207, *M. xenopi*, *M. novocastrense* et *M. shimoidei*, présentant un polymorphisme, A63M, à cette position (Petrella, Cambau et al. 2006; Huitric, Verhasselt et al. 2007).

La substitution de l'aspartate à la position 28 est la substitution qui présente le plus de variabilité. En effet, cette position a été trouvée substituée dans toutes les espèces pour lesquelles des clones résistants ont été sélectionnés et il existe 4 substitutions différentes décrites (D28A/V/G/P) (Andries, Verhasselt et al. 2005; Huitric, Verhasselt et al. 2010); cette étude) qui impliquent toutes la perte du groupement carboxylique et son remplacement par un résidu non chargé. Les clones que nous avons obtenus avec une mutation à cette position ont tous un niveau élevé de résistance au TMC207, quelle que soit l'espèce considérée (16 à 400 fois la CMI du sauvage). De plus, dans nos tests de complémentation, le plus haut niveau de résistance (133 fois la CMI du sauvage) a été mesuré pour les souches contenant la sous-unité c mutée à cette position, quelle que soit la nature de la substitution. C'est donc bien la perte du groupement carboxylique qui doit entraîner une diminution importante de la liaison de l'ATP synthase à la drogue, permettant aux souches contenant une enzyme mutée d'avoir un niveau de résistance élevé. Les résultats du docking du TMC207 dans notre modèle de l'anneau c de *M. tuberculosis* confirme l'importance du résidu Asp28 qui parait être bien positionné pour établir une liaison halogène avec l'atome de brome du TMC207 porté par le groupement quinoléine (Figure 58). Cette hypothèse semble confirmée par des résultats obtenus par Guillemont et coll. (Guillemont, Meyer et al. 2011) qui montrent l'importance du brome pour l'activité anti-mycobactérienne de la drogue dans une étude de QSAR (Quantitive Structure-Activity Relationship). Enfin, il est intéressant de noter que les espèces naturellement résistantes au

TMC207 identifiées par Andries et coll. (Andries, Verhasselt et al. 2005) n'ont pas d'aspartate à la position équivalente mais une isoleucine chez *E. coli* (Ile28, CMI > 32 mg/L) ou une valine chez *Corynebacterium jeikeium* (Val28, CMI = 4 mg/L).

Comme nous l'avons expliqué précédemment, le Glu61 est le résidu qui permet le transport des ions dans les ATP synthases. C'est donc un résidu essentiel pour le fonctionnement de cette enzyme. Il s'avère que la seule substitution possible pour conserver l'activité de l'enzyme est E61D, permettant ainsi la conservation du groupement carboxylate. Dans notre étude, cette substitution intervient dans 5 clones résistants au TMC207 pour lesquels la CMI est augmentée de 16 à 33 fois par rapport la CMI de la souche sauvage. Une augmentation de 4 fois par rapport à la CMI du sauvage a également été observée dans nos tests de complémentation. Ces effets sont certainement dus au raccourcissement de la chaîne latérale qui porte le groupement carboxylate impliqué dans la liaison de la drogue via deux interactions moléculaires avec l'hydroxyle (liaison hydrogène) et le groupement diméthylamino (pont salin) du TMC207 (Figure 58). L'importance de ces interactions est confirmée par des travaux menés par d'autres équipes qui montrent (i) que le remplacement du groupement diméthylamino par des fonctions qui ne sont plus basiques, ou, alternativement, le raccourcissement de la chaîne latérale portant ce groupement diminuent significativement l'activité de la drogue (Guillemont, Meyer et al. 2011) et (ii) que les forces électrostatiques sont un facteur important pour la liaison du TMC207 à la sous-unité c de l'ATP synthase mycobactérienne (Haagsma, Podasca et al. 2011).

La mutation Ile→Met à la position 66 introduit au niveau du site de fixation du TMC207 une chaîne latérale stériquement encombrante portant un atome de soufre. Les clones résistants contenant une ATP synthase substituée à la position 66, ainsi que les souches de *M. smegmatis* complémentées avec une sous-unité c substituée à cette position, ont un niveau de résistance identique à celui observé pour la substitution E61D. Lorsque l'on considère l'orientation de la chaîne latérale du résidu 66 dans notre modèle, on voit que l'introduction d'une méthionine va entrainer des contacts stériques entre le groupement thiométhyle de la méthionine et le groupement tyrosinate de Tyr64 (Figure 57A). Deux conséquences possibles de ces contacts pourraient être une gêne stérique au niveau du groupement

quinoléine entre les deux hélices C-terminales, et une disparition de la liaison hydrogène entre Tyr64 et l'atome d'oxygène du groupement 2-oxyméthyle de la drogue. A ce jour, aucun mutant de la position 64 n'a été identifié parmi les mutants de mycobactéries résistants au TMC207, ne permettant donc pas de confirmer l'existence de cette liaison entre la drogue et la tyrosine, mais cette absence de mutants pourrait être expliquée par le rôle essentiel que jouerait la tyrosine en position 64 dans l'activité de l'ATP synthase. Enfin, nos résultats confirment des études de QSAR qui ont montré que le groupement oxyméthyle à la position 2 du cycle quinoléine joue un rôle important dans l'activité du TMC207. En effet, son remplacement par d'autres substituents est très délétère pour le potentiel inhibiteur de la drogue (Guillemont J, 2011).

Enfin, la substitution L59V, identifiée pour la première fois dans notre étude, est associée à une augmentation modérée de la résistance au TMC207 dans les clones résistants et dans les souches de *M. smegmatis* complémentées (4 fois la CMI de la souche sauvage). La principale modification structurale entrainée par la substitution d'une leucine en valine à la position 59 est le déplacement du groupement isopropyle vers l'intérieur du site de fixation du TMC207, ce qui doit induire un encombrement stérique inhibant la stabilisation du TMC207 au niveau de la poche délimitée par les deux hélices C-terminales dans l'anneau c.

L'ensemble de nos résultats montrent que le TMC207 inhibe l'ATP synthase mycobactérienne en interagissant avec l'anneau c au niveau d'une poche centrée sur le Glu61. Ce site est localisé entre deux hélices C-terminales provenant de deux monomères c adjacents, dont la topologie est déterminée par les acides aminés localisés de part et d'autre du site (Leu59, Glu61, Ala63 et Ile66) et au fond de ce site (Asp28). Ces résidus correspondent à la totalité des mutations identifiées dans les clones résistants au TMC207. Notre hypothèse s'inscrit au départ dans celle publiée par De Jonge et coll. (de Jonge, Koymans et al. 2007) qui proposent que le TMC207 adopte une conformation cyclique particulière pour traverser la membrane. Dans cette conformation, qui correspond à la forme déprotonée de l'antibiotique, une liaison hydrogène intramoléculaire est formée entre le groupement hydroxyl d'une part, et l'azote du groupement di-méthylamine d'autre part (voir Figure 74A), ce qui permet de protéger les atomes polaires de la drogue par rapport à l'environnement hydrophobe de la membrane.

Lorsque le TMC207 arrive au niveau de l'anneau c de l'ATP synthase, et plus précisément dans la région de liaison centrée autour du Glu61, on peut supposer que le noyau bromo-quinoléine de l'antibiotique déprotoné s'insère entre deux sous-unités c (Figure 74B) et est stabilisé d'une part par la liaison halogène entre le brome et la chaine latérale de Asp28 et, d'autre part, par la liaison H entre le groupe OH et la chaine latérale de la tyrosine 64. Une fois l'ancrage réalisé, la chaîne latérale du Glu61 se réoriente dans une conformation « ouverte », comme cela a été décrit pour l'interaction du DCCD avec le Glu62 de l'anneau c de *S. platensis* (Pogoryelov, Krah et al. 2010), qui permet le transfert du proton de l'acide carboxylique vers l'atome d'azote du groupement di-méthylamine du TMC207 qui va adopter une conformation étendue. Dans cette conformation, une liaison électrostatique s'établie entre le Glu61 d'une sous-unité c et le groupement amine disubstitué protoné de l'antibiotique (Figure 74C). On peut souligner ici que dans ce modèle, les interactions hydrophobes entre les groupements naphtyle et phényle du TMC207 et la bicouche lipidique environnante contribuent également à stabiliser l'ancrage de l'antibiotique à l'anneau c, avec pour conséquence le blocage du cycle de transfert des protons et de la rotation de l'anneau c dans la membrane. Une molécule de TMC207 liée à une sous-unité c serait ainsi suffisante pour inhiber l'ATP synthase.

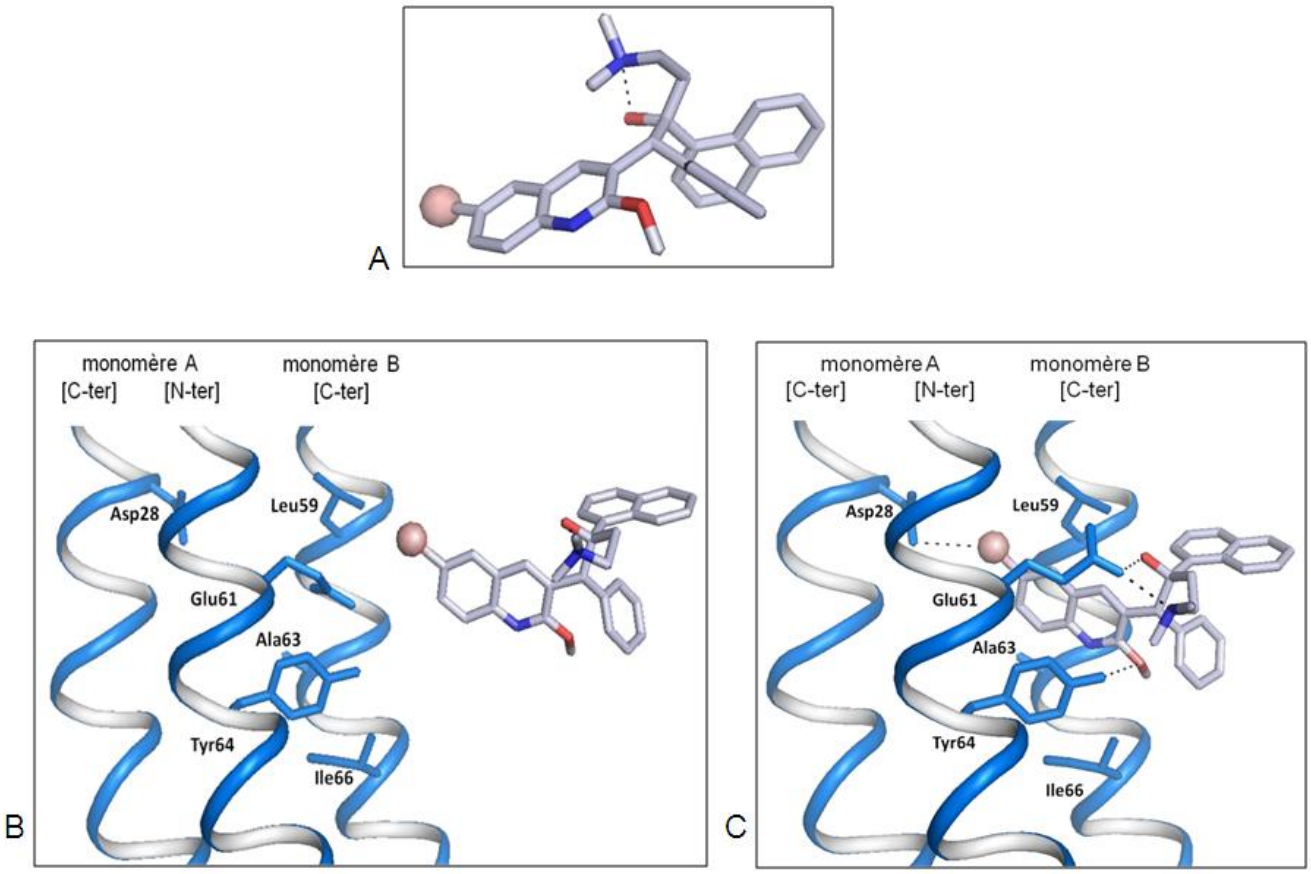


Figure 74. Mode d'action du TMC207. (A) TMC207 en conformation cyclique déprotonée. (B) Le TMC207 arrive au niveau de l'anneau c de l'ATP synthase dans la région de liaison centrée autour du Glu61. (C) Ancrage du TMC207 à la sous-unité c de l'ATP syntahse et transition vers la conformation protonée étendue (les liaisons hydrogène et halogène sont représentées par des pointillés.

De Jonge et coll. ont proposé en 2007 un premier modèle structural de la poche de fixation du TMC207 dans l'ATP synthase mycobactérienne à l'interface entre la sous-unité a et la sous-unité c (de Jonge, Koymans et al. 2007). Dans ce modèle, la structure de l'anneau c a été construite par homologie à partir du modèle structural du domaine F_O d'*E. coli* qui a lui-même été construit à partir d'un assemblage modélisé à partir de la structure d'un seul monomère c déterminée par RMN (PDB 1C17) (Rastogi and Girvin 1999). Depuis la publication de ce modèle, plusieurs structures d'anneaux c ont été résolues par diffractions des rayons X, démontrant que le modèle d'anneau reconstruit pour *E. coli* était en grande partie inexact. L'équipe de Meier et coll. a notamment démontré que la conformation du monomère c d'*E. coli* déterminée par RMN n'était pas cohérente avec l'organisation spatiale des monomères lorsqu'ils sont structurés en anneau

(Meier, Polzer et al. 2005). De plus, lorsqu'on mesure les écarts quadratiques moyens (rmsd) de la superposition d'un monomère c d'*I. tartaricus* et de *S. platensis* sur un monomère d'*E. coli*, on trouve des valeurs de rmsd d'environ 4.5Å, confirmant que la structuration obtenue par RMN est spécifique d'un état de monomère isolé et ne correspond pas à celui d'un assemblage en anneau. Ces résultats remettent donc en question la validité du premier modèle du site de fixation du TMC207 proposé initialement par De Jonge, et soulignent la nécessité d'utiliser des structures cristallographiques expérimentales d'anneaux de sous-unités c pour modéliser celui de *M. tuberculosis*. D'autre part, dans une étude biochimique récente basée sur le modèle de De Jonge, Haagsma et coll. suggèrent que le TMC207 se fixe dans un site autre que celui du proton et qu'il n'y a pas de compétition entre la liaison du TMC207 et le flux de proton (Haagsma, Podasca et al. 2011). Ces résultats découlent d'expériences de Biacore réalisées (i) à partir de la sous-unité c de *M. tuberculosis* exprimée chez *E. coli* après marquage par une étiquette His et (ii) d'un dérivé du TMC207 dans lequel l'atome de brome a été supprimé pour être remplacé par un analogue aminé afin de permettre sa fixation sur les puces d'analyses Biacore. Compte tenu des conditions expérimentales très particulières utilisées dans ce travail, on peut remettre en question de telles conclusions dans la mesure où :

(i) aucune preuve expérimentale n'a été apportée quant à l'état de la sous-unité c après purification (anneau complet *versus* monomère, la présence de deux monomères adjacents étant le minimum requis pour que la poche de fixation du TMC207 soit formée), et

(ii) l'atome de brome qui est essentiel pour la stabilisation du TMC207 sur le domaine F_O de l'ATP synthase a été substitué par une fonction utilisée pour coupler l'antibiotique aux groupements carboxyméthyl de la puce, empêchant ainsi toute approche des sous-unités c de l'anneau au niveau du groupe Br-quinoléine de l'antibiotique.

Parallèlement à ce travail, nous nous sommes égalemet intéressés aux clones de *M. tuberculosis* et *M. abscessus* résistants au TMC207, sélectionnés sur des concentrations plus faibles en antibiotique (0.5 µg/ml) et ne présentant aucune substitution dans la sous-unité c, ni dans la sous-unité a. Pour un de ces

clones, l'opéron *atp* complet (8 gènes, domaines F_1 et F_O) a été séquencé et la séquence était identique à celle de l'opéron de la souche sauvage. Ayant par ailleurs montré qu'il n'y avait qu'une seule copie de l'opéron *atp* dans ces clones, nous avons émis l'hypothèse que le mécanisme de résistance au TMC207 n'était pas lié, dans ces clones, à la présence de mutations dans l'ATP synthase et nous avons cherché à identifier quel(s) autre(s) mécanisme(s) de résistance pouvait expliquer la résistance au TMC207 dans ces souches de *M tuberculosis* et *M. abscessus*.

Le DCCD est un inhibiteur de l'ATP synthase de toutes les espèces vivantes qui se fixe de manière covalente sur le carboxylate de l'anneau c. Un des mécanismes de résistance décrit pour cette molecule est la surexpression de l'ensemble du complexe enzymatique de l'ATP synthase (Novakova, Majernik et al. 2009). En nous basant sur ces données, nous avons cherché à savoir si une surexpression de l'ATP synthase dans les clones résistants sans mutation dans la sous-unité c pouvait expliquer le bas niveau de résistance détecté pour ces clones. Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord cherché à déterminer si le seul système connu pour être impliqué dans la régulation de l'expression de l'ATP synthase chez les mycobactéries, l'homologue du système BlaI/BlaR, n'était pas muté. Les résultats que nous avons obtenus indiquent qu'il n'y a aucune mutation dans ce système de regulation, quelle que soit l'espèce. Dans un deuxième temps, nous avons recherché si une surexpression de l'ARNm du gène *atpE* pouvait être détectée par des expériences de RT-PCR en temps réel dans les clones de *M. abscessus*. Les résultats obtenus ne nous permettent pas à ce jour de proposer que la surexpression de l'ATP synthase pourrait représenter un deuxième mécanisme de résistance au TMC207 (seul un clone surproduisant de façon significative l'ATP synthase a pu être détecté).

Pami les hypothèses alternatives qui peuvent être formulées pour expliquer la résistance observée dans les clones non mutés dans l'ATP synthase, nous ne pouvons pas exclure (i) une inactivation de la drogue et (ii) une modification de régulateurs transcriptionnels pléiotropes pouvant affacter la résistance intrinsèque des mycobactéries, comme *whiB7* qui affecte le métabolisme cellulaire (Burian, Ramon-Garcia et al. 2011) ou *phoP* qui contrôle directement ou indirectement de nombreuses fonctions telles que la respiration et le métabolisme des lipides

(Gonzalo-Asensio, Mostowy et al. 2008). Pour essayer d'identifier le ou les mécanisme(s) de résistance dans ces clones, nous envisageons de séquencer le génome complet d'un ou plusieurs clones obtenus à partir de *M. abscessus* et *M. tuberculosis* ainsi que le genome des souches sauvages correspondantes. La comparaison des génomes devrait nous apporter les informations nécessaires pour répondre à cette question, comme cela a été fait pour identifier l'ATP synthase comme cible du TMC207 (Andries, Verhasselt et al. 2005).

La deuxième partie du projet a porté sur l'expression et la purification de l'ATP synthase mycobactérienne et plus particulièrement de sa sous-unité c. L'ATP synthase est une enzyme ubiquitaire présente dans tous les organismes vivants. Elle est à la base de la production d'ATP et elle est indispensable à la survie des mycobactéries (Tran and Cook 2005). Malgré son rôle cellulaire essentiel, son mécanisme catalytique est encore très peu caractérisé et aucune structure tridimensionnelle de l'ATP synthase complète n'est disponible pour le moment. La structure complète de 6 sous-unités (α, β, γ, δ, ε, c) ainsi que la structure partielle de la sous-unité b, parmi les 8 sous-unités constituants les deux domaines F_1 et F_O, ont été résolues (les codes PDB de toutes les structures résolues sont en annexe 4). Pour l'anneau transmembranaire de sous-unités c, 4 structures issues de différentes espèces sont disponibles mais nous n'avons aucune information structurale et biochimique concernant l'anneau de sous-unités c de l'ATP synthase mycobactérienne. Afin de caractériser cette nouvelle cible thérapeutique, nous avons développé des protocoles permettant l'expression et la purification de l'anneau c de *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*, mais également de l'ATP synthase complète de *M. smegmatis*.

La purification des protéines membranaires reste encore un grand défi pour la biologie structurale. Les protéines membranaires sont impliquées dans les processus essentiels de la cellule : canaux ioniques, transport et couplage énergétique, translocation et insertion des protéines, fusion membranaire, récepteurs hormones, ligands et voies de signalisation, etc.... Leur caractérisation biochimique et structurale est donc cruciale car elles représentent deux tiers des cibles thérapeutiques actuelles (Arinaminpathy, Khurana et al. 2009). Au total, elles sont codées par environ 30% des gènes issus des génomes actuellement

séquencés, mais parmi les 76400 structures déposées dans la PDB (http://www.pdb.org), seules 1500 (2%) proviennent de protéines membranaires (environ 1300 protéines en α-hélices et 200 en tonneau-β) (PDBTM, Protein Data Bank of Transmembrane Proteins http://pdbtm.enzim.hu). Cette grande disparité d'infomations disponibles pour les protéines solubles par rapport aux protéines membranaires est principalement due à la difficulté de manipulation des ces dernières.

Parmi les structures de protéines résolues disponible dans la PDB, il y a 857 structures provenant de *M. tuberculosis*, pour un totale de 328 gènes étudiées (*Mycobacterium tuberculosis* Structural Database, MtbSD, http://bmi.icmr.org.in /mtbsd). Au sein de ces 857 structures, uniquement trois sont celles de protéines membranaires : la protéine Rv1761c composée de 2 hélices α transmembranaires et 4 extramembranaires dont la structure a été résolue par RMN (code PDB 2K3M) (Page, Lee et al. 2009), le canal MscL organisé en homopentamère dont chaque sous-unité contient 2 hélices transmembranaires et une hélice cytoplasmique dont la structure a été résolue par cristallographie aux rayons X à une résolution de 3.5 Å (code PDB 2OAR) (Chang, Spencer et al. 1998) et le canal oligoméric OmpATb dont la structure a été résolue par RMN (code PDB 2KGS) (Yang, Auguin et al. 2011). Une autre structure de protéine membranaire mycobactérienne est disponible dans la PDB : la porine MspA de *M. smegmatis* composée de feuillet β, dont la structure a été résolue par cristallographie aux rayons X à une résolution de 2.5 Å (code PDB 1UUN) (Faller, Niederweis et al. 2004).

Pour surmonter les difficultés liées à l'expression et la purification d'une protéine membranaire mycobactérienne, nous avons mis au point plusieurs systèmes d'expression, homologue et hétérologue, et nous avons testé plusieurs types de purification de la sous-unité c de *M. tuberculosis* et de *M. smegmatis.*

L'expression hétérologue chez *E. coli* a été particulièrement difficile. Nous avons testé 6 constructions plasmidiques permettant l'expression de la sous-unité de *M. tuberculosis* avec ou sans His-tag, mais aucune ne nous a permis d'exprimer la protéine chez *E. coli*. Une des hypotheses que nous formulons est que l'anneau mycobactérien ne peut pas s'insérer dans la membrane d'*E. coli* en raison de l'absence d'un protéine chaperonne indispensable absente chez *E. coli.*

La sous-unité c serait alors dégradée et donc indétectable. Ce problème de stabilité a été résolu grâce à l'expression de la sous-unité c de sous forme de protéine de fusion avec la MBP. Grâce à cette construction, nous avons réussi à purifier la protéine recombinante et à en obtenir des quantités importantes (environ 7.5 mg/ml). La MBP a les propriétés d'une protéine chaperonne lui permettant de favoriser le repliement des protéines et ainsi de les conserver sous forme soluble. Malheureusement, les différents tests de digestion effectués en présence de détergent afin de séparer la MBP de la sous-unité c ne nous ont pas permis de récupérer la sous-unité c, que ce soit sous forme monomèrique ou oligomérique. Nous avons tout de même fait plusieurs tests de cristallisation sur la protéine recombinante car il existe plusieurs exemples de protéines recombinantes dont la structure a pe être obtenue par cette approche (dans ce cas, la structure 3D peut être résolue en utilisant la MBP comme modèle de départ pour le remplacement moléculaire). Ces tests nous ont permis d'obtenir des cristaux qui, dans l'état actuel des choses, diffractent à trop basse resolution pour pouvoir être exploités. Il faudra les reproduire et les améliorer pour espérer obtenir la structure de la protéine de fusion et ainsi une information structurale sur un monomère c mycobactérien.

L'expression homologue chez *M. smegmatis* a également été difficile à mettre au point, mais elle a finalement permis d'obtenir de bons résultats. Notre première stratégie consistait à purifier la sous-unité c sans et avec un His-Tag. Elle ne nous a pas permis d'isoler l'anneau c, mais nous avons réussi à purifier les sous-unités α et β de l'ATP synthase après un passage sur chromatographie d'affinité de nickel. Ce résultats était bien la preuve que la sous-unité c taggée était présente mais pas en quantité suffisante pour être détectable. Notre hypothèse est que le tag doit gêner l'assemblage de l'anneau c ou son insertion dans la membrane, la protéine taggée étant défavorisée par rapport à la protéine native produite par la bactérie. Notre deuxième stratégie a consisté à purifier la sous-unité β issue du domaine F_1 soluble à l'aide d'un His-Tag. Elle nous a permis de purifier l'ATP synthase entière en présence de Triton X100 comme détergent pour la solubilisation, et de DDM comme détergent pour la purification. Au vu de tous les tests faits lors de cette étude, il ressort que, pour purifier un complexe multiprotéique membranaire *chez M. smegmatis*, il est intéressant de tester en

priorité la solubilisation/purification en présence de Triton X100/DDM, et d'ajouter un tag sur une des protéines solubles du complexe pour aider à la purification. Grâce à la protéine purifiée par cette methode, nous avons pu obtenir la première image préliminaire en microscopie électronique d'une ATP synthase mycobactérienne, sur laquelle on voit les deux domaines F_1 et F_O liés l'un à l'autre. Ce résultat préliminaire est très important, car il valide notre stratégie de purification et nous permet d'envisager l'optimisation de la purification afin d'avoir un échantillon encore plus homogène.

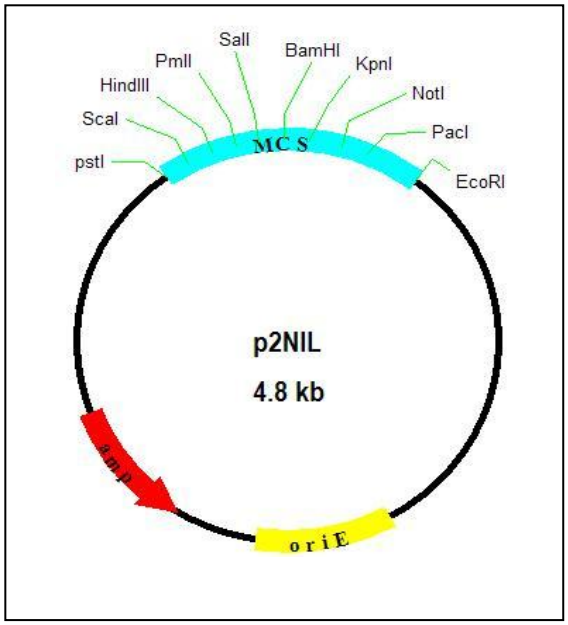
La résolution par microscopie électronique de la structure de l'ATP synthase de *M. smegmatis* à basse résolution, nous permettra d'obtenir des informations cruciales, tel quel le nombre de monomères dans l'anneau c qui nous permettra d'améliorer notre modèle structural au niveau du site de fixation du proton. De plus, cette technique devrait également nous permettre de visualiser pour la toute première fois le site de liaison du TMC207 sur sa cible.

ANNEXES

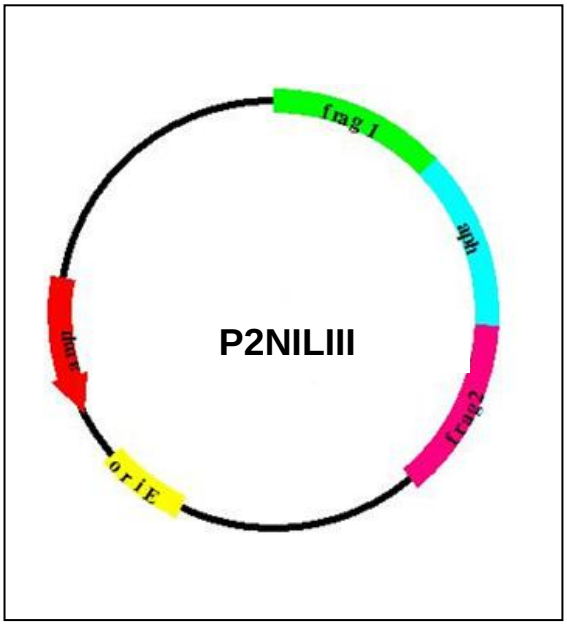
Annexe 1 : carte des vecteurs utilisés

Les vecteurs sont en ordre alphabétique.

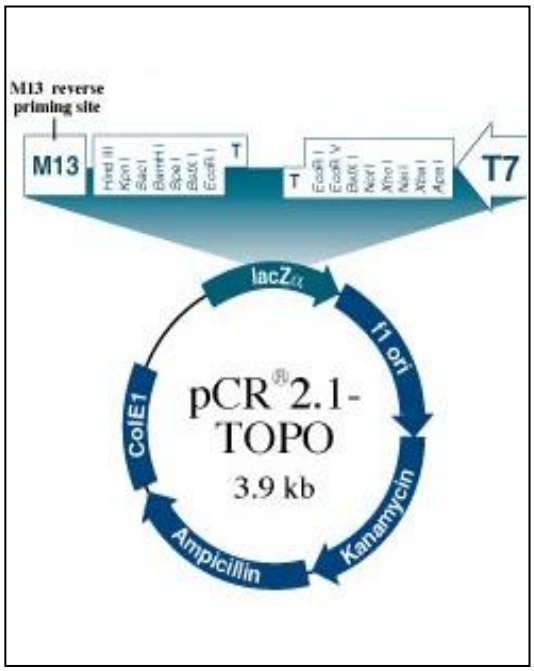
p2NIL



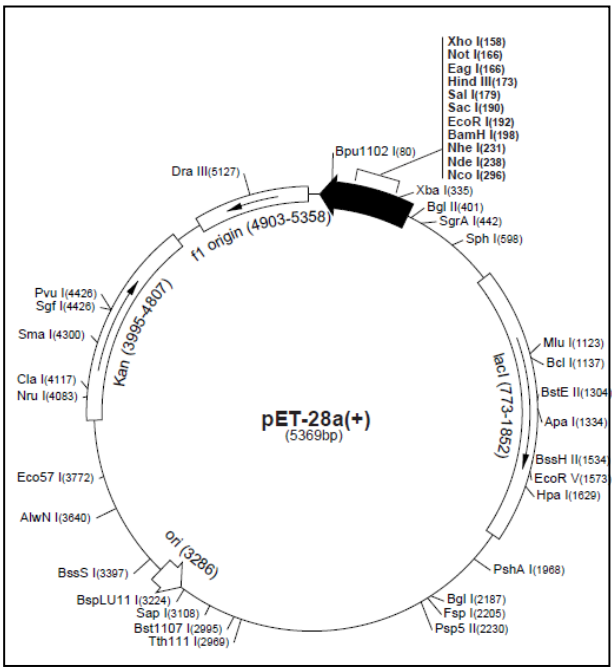
p2NILIII



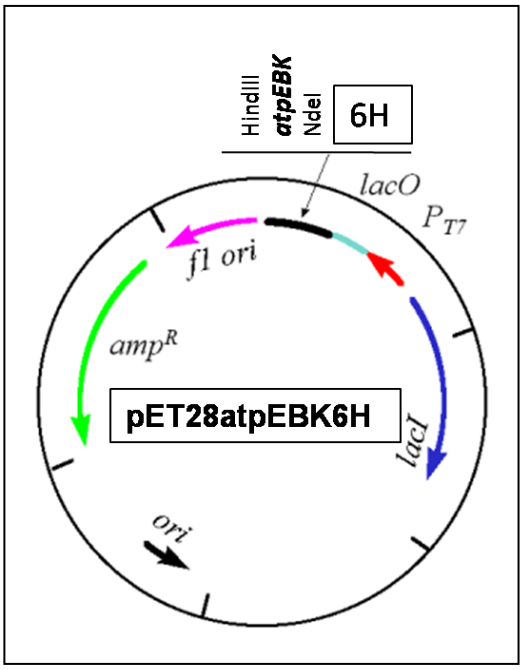
pCR2.1-TOPO



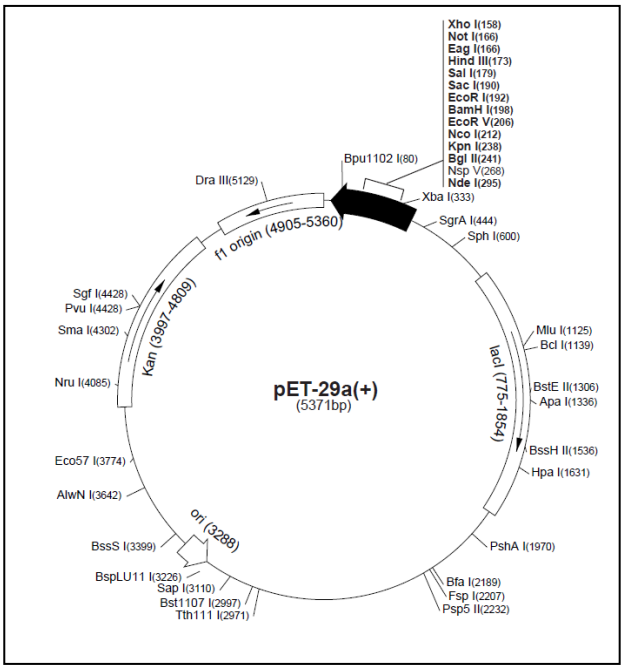
pET28a



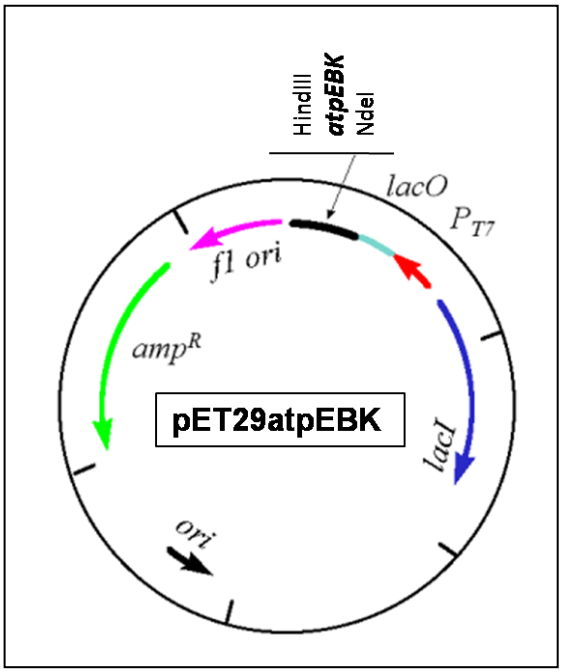
pET28atpEBK6H



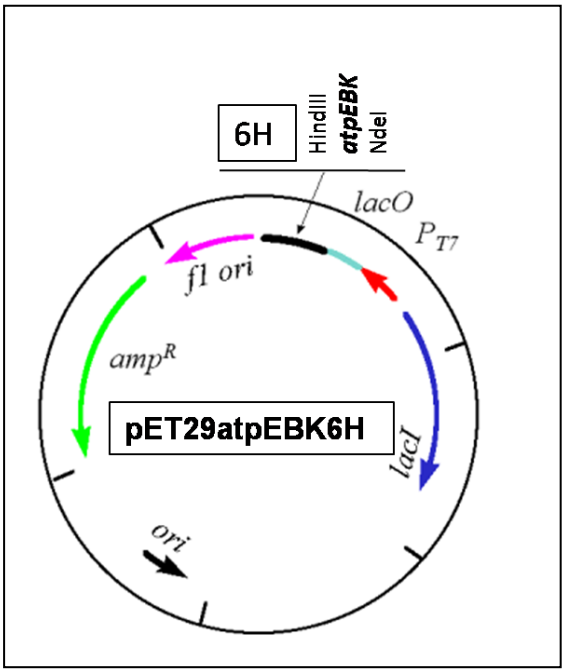
pET29a



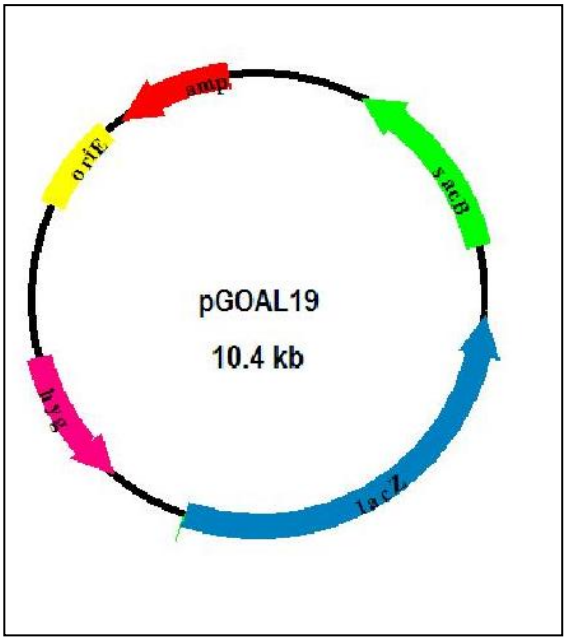
pET29atpEBK



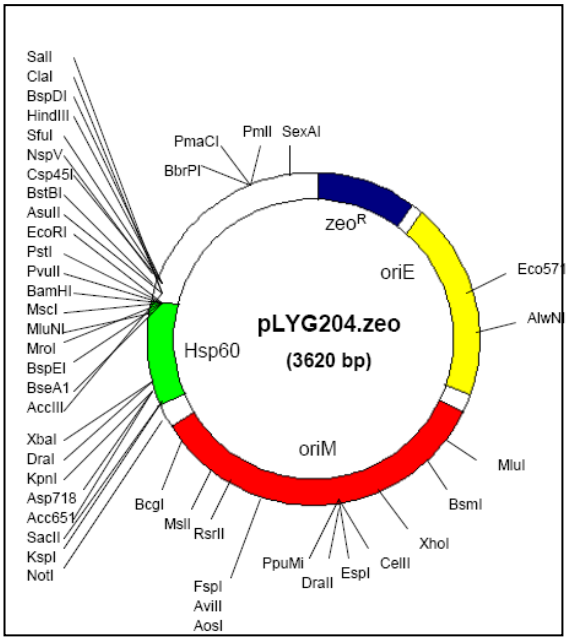
pET29atpEBK6H



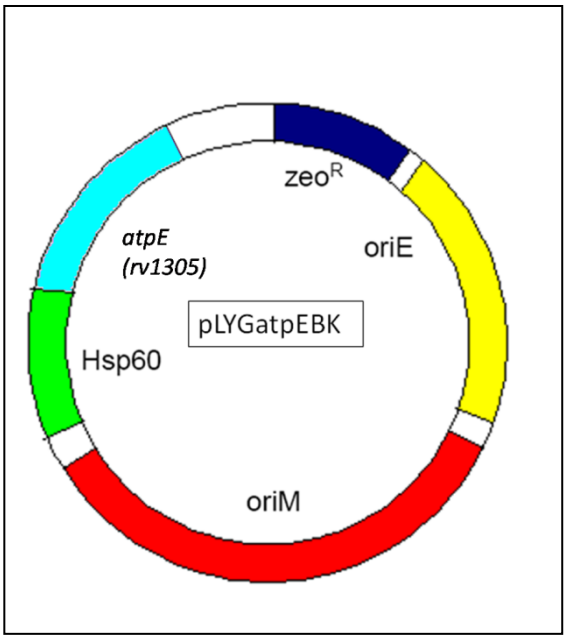
pGOAL19



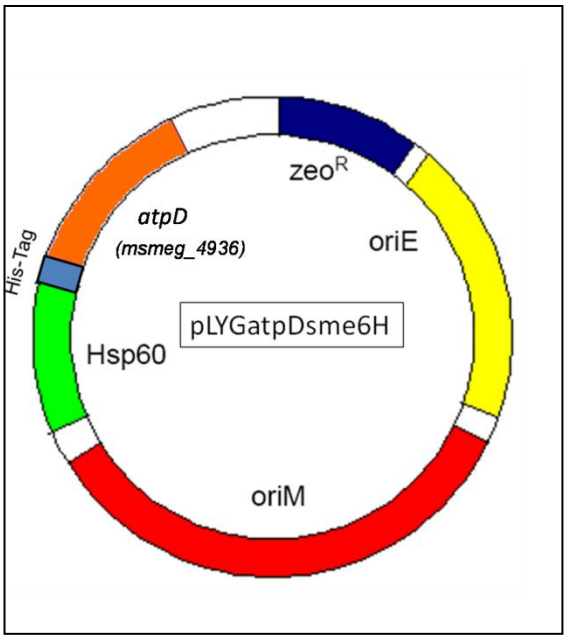
pLYG204.zeo



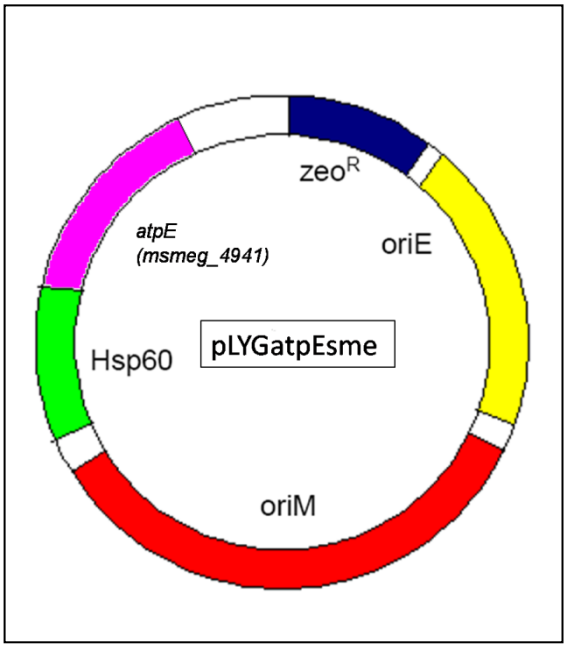
pLYGatpEBK



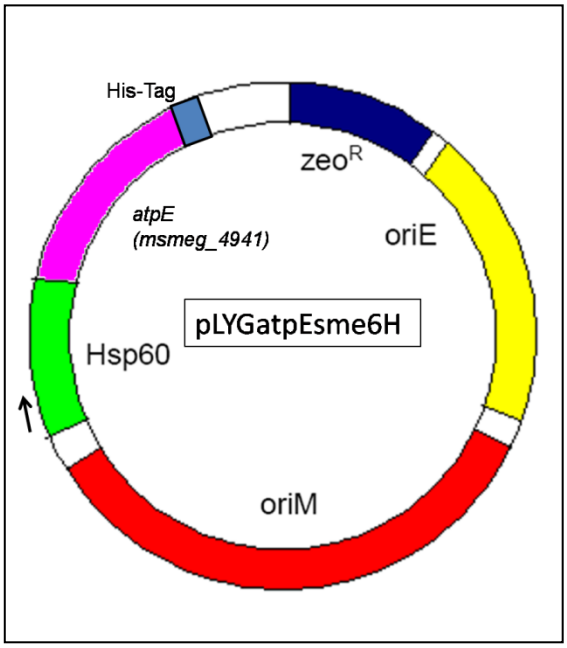
pLYGatpDsme6H



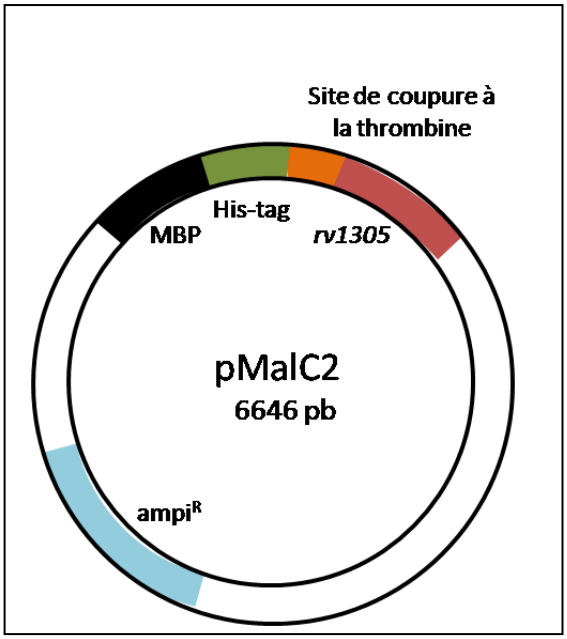
pLYGatpEsme



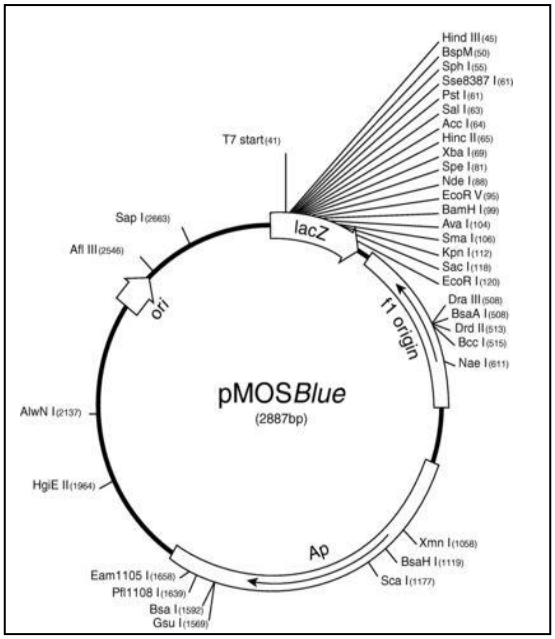
pLYGatpEsme6H



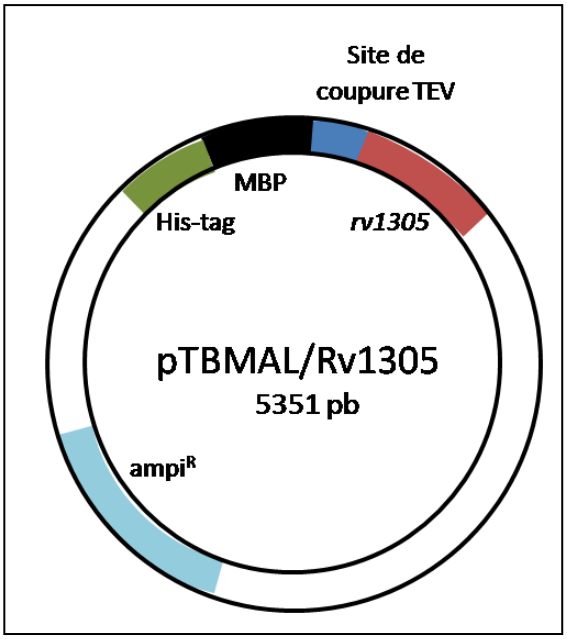
pMALc2



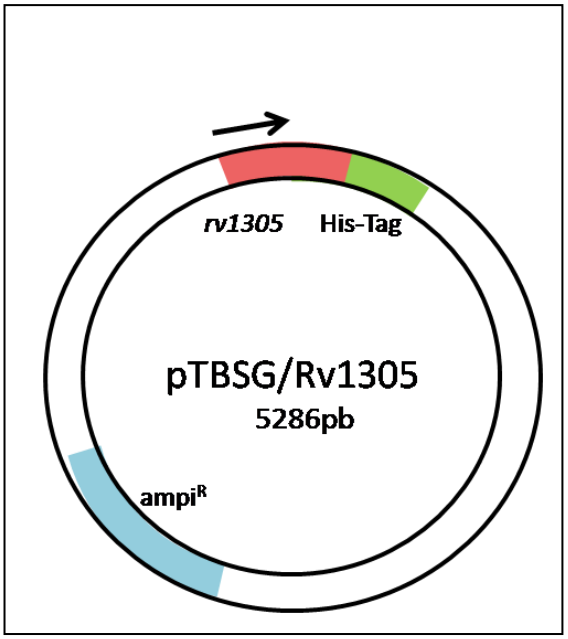
pMOSBlue



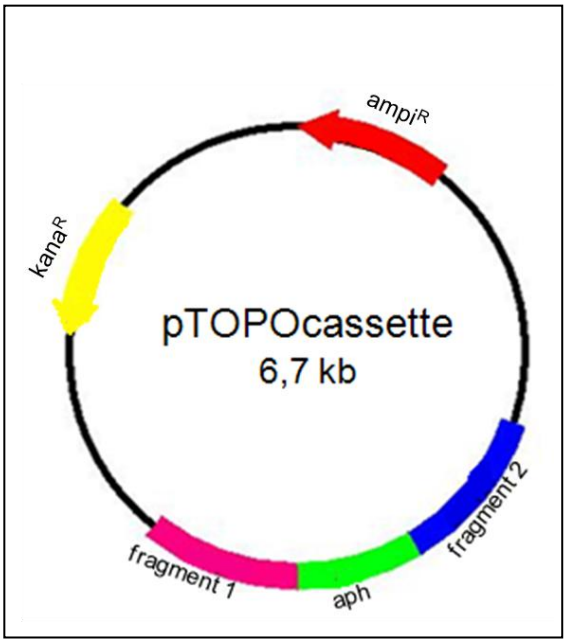
pTBMAL/Rv1305



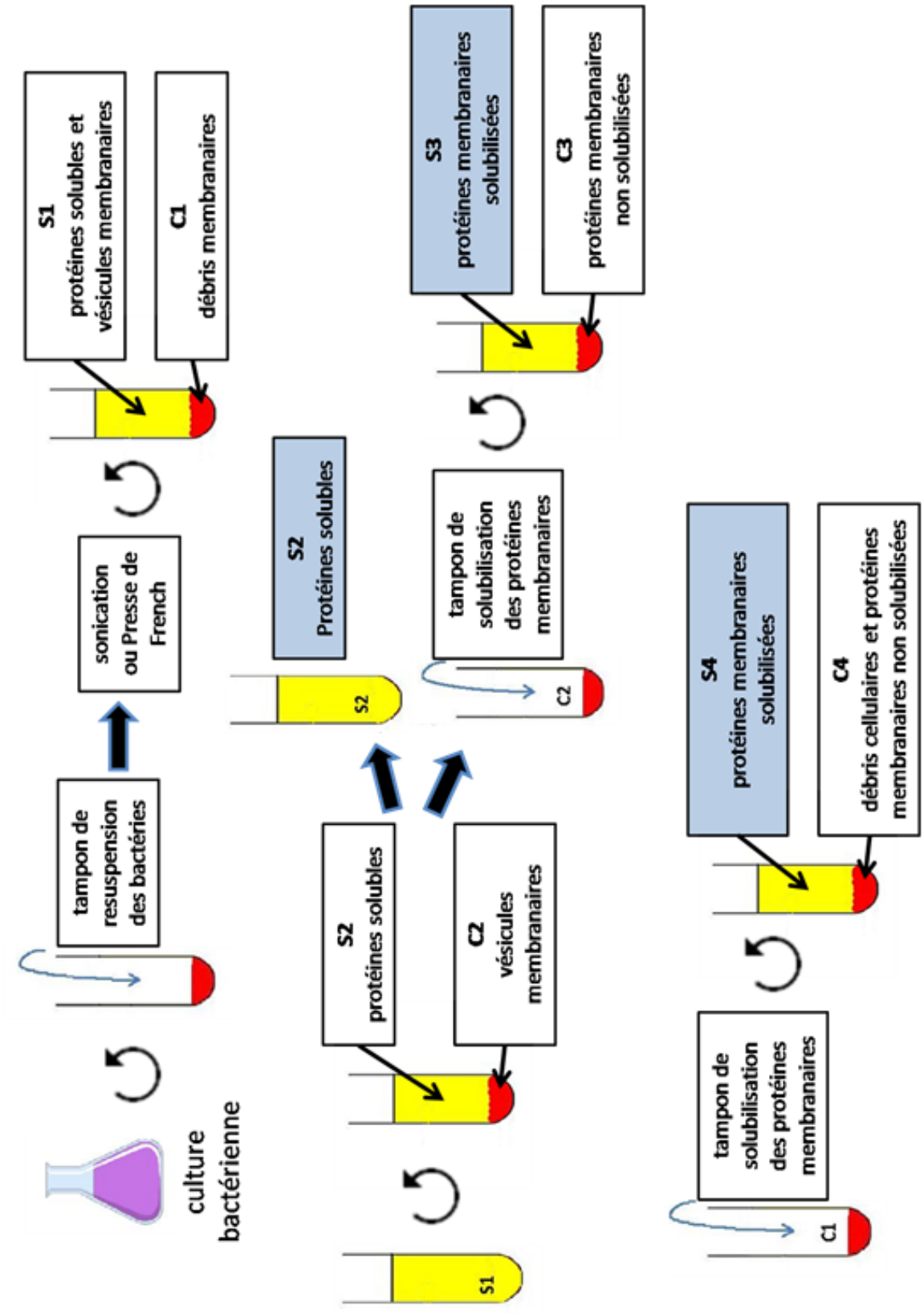
pTBSG/Rv1305



pTOPOcassette



Annexe 2 : Schéma des étapes de la purification d'une protéine membranaire



Annexe 3 : Tableau récapitulatif des tests d'expression de la sous-unité c de *M. tuberculosis* chez *E. coli*

Construction plasmidique	Souche de *E. coli*	Méthode de lyse	Induction (°C - heures)	Concentration IPTG (mM)	Détergent solubilisation	Détergent purification	Résine purification	SDS-PAGE#	Western Blot
pET29atpEBK	BL21, BL21 C+ C43, C44	sonication	18 (16h) 30 -37 (3h)	0.4 1	SDS Triton X100	non testé	non testé	- § -	- -
pET28atpEBK6H	BL21, BL21 C+ C43, C44	sonication	18 (16h) 30 -37 (3h)	0.4 1	SDS Triton X100	non testé	non testé	- § -	- -
pET29atpEBK6H	BL21, BL21 C+ C43, C44	sonication	18 (16h) 30 -37 (3h)	0.4 1	SDS Triton X100	Triton X100 DDM	nickel	-	-
pTBSG/Rv1305	BL21 C+	sonication	37 (3h)	1	DDM	DDM	nickel	-	-
pMALc2	BL21 C+	sonication presse de French	18 (16h) 37 (3h)	1	DDM	DDM TriDM N-Lauroylsarcosine	nickel amylose	+ +	+ +
pTBMAL/Rv1305	BL21 C+	sonication	37 (3)	1	DDM	DDM	nickel amylose	+ +	+ +

Gel SDS-PAGE de la fraction de purification ou, à default, de l'extrait brut.

§ Pas de bande majoritaire sur gel SDS-PAGE

Annexe 4 : Codes PDB de toutes les structures résolues des sous-unités de la F_1F_O-ATP synthase

Organisme	Sous-unité(s)	Méthode	Code PDB
DOMAINE F_O			
Escherichia coli	b - partie membranaire	RMN	1B9U
Escherichia coli	b - domaine de dimérisation	Cristallographie aux rayons X + SAXS	1L2P
Mitochondrie *Bos taurus*	b - partie soluble (+ sous-unités d et F6)	Cristallographie aux rayons X	2CLY
Ilyobacter tartaricus	anneau c	Cristallographie aux rayons X	1YCE-2WGM
Spirulina platensis	anneau c	Cristallographie aux rayons X	2WIE-2XQU-2XQS-2XQT
Bacillus pseudofirmus OF4	anneau c	Cristallographie aux rayons X	2X2V
Choloroplaste *Spinacia oleracea*	anneau c	Cristallographie aux rayons X	2W5J
Escherichia coli	monomère c	RMN	1A91-1C0V
Escherichia coli	monomère c - état déprotoné	RMN	1C99
Escherichia coli	monomère c -mutations	RMN	1L6T-1IJP
Bacillus PS3	monomère c	RMN	1WU0
DOMAINE F_1			
Thermotoga maritima	α	Cristallographie aux rayons X	2R9V
Chloroplaste *Spinacia oleracea*	$\alpha_3\beta_3$	Cristallographie aux rayons X	1FX0
Chloroplaste *Spinacia oleracea*	$\alpha_3\beta_3$ + tentoxin	Cristallographie aux rayons X	1KMH
Bacillus PS3	$\alpha_3\beta_3$	Cristallographie aux rayons X	1SKY
Mitochondrie *Rattus norvegicus*	$\alpha_3\beta_3\gamma$	Cristallographie aux rayons X	1MAB-2F43
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3\beta_3\gamma$	Cristallographie aux rayons X	1BMF
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3\beta_3\gamma$ + aluminuim floride	Cristallographie aux rayons X	1H8E
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3\beta_3\gamma$ + IF1	Cristallographie aux rayons X	1OHH

Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma$ + beryllium floride	Cristallographie aux rayons X	1W0J-1W0K
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma$ + azide	Cristallographie aux rayons X	2CK3
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma$ + aurovertin B	Cristallographie aux rayons X	1COW
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma$ + Mg2+(ADP) et aluminuim floride	Cristallographie aux rayons X	1E1R
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma$ + efrapentin	Cristallographie aux rayons X	1EFR
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma$ + 5MM AMP PNP	Cristallographie aux rayons X	1H8H
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma$ + resveratrol	Cristallographie aux rayons X	2JIZ
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma$ + 4-chloro-7-nitrobenzofurazan	Cristallographie aux rayons X	1NBM
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma$ + piceatannol	Cristallographie aux rayons X	2JJ1
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma$ + quercetin	Cristallographie aux rayons X	2JJ2
Bacillus sp. TA2.A1	$\alpha_3 \beta_3 \gamma \varepsilon$	Cristallographie aux rayons X	2QE7
Escherichia coli	$\alpha_3 \beta_3 \gamma$	Cristallographie aux rayons X	1D8S
Escherichia coli	$\alpha_3 \beta_3 \gamma \varepsilon$	Cristallographie aux rayons X	1JNV-3OAA
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \varepsilon$	Cristallographie aux rayon X	2JDI-2W6E-2W6F-2W6G-2W6H-2W6I-2W6J
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \varepsilon$ + DCCD	Cristallographie aux rayons X	1E79
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \varepsilon$ + I1-60HIS	Cristallographie aux rayons X	1V7Q
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \varepsilon$ (+ sous-unités OSCP, b, D et F6)	Cristallographie aux rayons X	2WSS
Saccharomyces cerevisiae	$\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \varepsilon$	Cristallographie aux rayons X	2HLD-3FKS
Saccharomyces cerevisiae	$\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \varepsilon$ - mutations	Cristallographie aux rayons X	3OEE-3OEH-3OE7-3OFN
Escherichia coli	δ – domaine N-terminal	RMN	1ABV
Escherichia coli	δ – domaine N-terminal + α - domaine N-terminale	RMN	2A7U

Bacillus PS3	ε – domaine C-terminal	Cristallographie aux rayons X	2E5U
Bacillus PS3	ε – domaine C-terminal + ATP	Cristallographie aux rayon X	2E5T
Bacillus PS3	ε + ATP	Cristallographie aux rayons X	2E5Y
Escherichia coli	ε	RMN	1BSH-1BSN
Escherichia coli	ε	Cristallographie aux rayons X	1AQT
Thermosynechococcus elongatus BP-1	ε	RMN	2RQ6
DOMAINE F_O+F_1			
Mitochondrie *Bos taurus*	$\alpha_3 \beta_3 \gamma \delta \varepsilon c_8$	Cristallographie aux rayons X	2XND
Saccharomyces cerevisiae	$\alpha_3 \beta_3 \gamma \varepsilon c_{10}$	Cristallographie aux rayons X	1QO1-2XOK-2WPD

Annexe 5 : Publication

Publication soumise dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Characterization of new mutations in the mycobacterial ATP synthase: New insights in the binding of the diarylquinoline TMC207 to the ATP synthase c-ring structure.

ELENA SEGALA, WLADIMIR SOUGAKOFF, AURELIE NEVEJANS-CHAUFFOUR, VINCENT JARLIER AND STEPHANIE PETRELLA*.

ABSTRACT

TMC207 is a new antituberculous drug belonging to the diarylquinoline class, which inhibits very efficiently the ATP synthase of mycobacteria such as *Mycobacterium tuberculosis*, one of the most important pathogens in the world. In order to map the amino acid residues involved in the binding of the drug, we have selected *in vitro* TMC207-resistant mutants from *M. tuberculosis* and diverse atypical mycobacteria. Six distinct mutations, Asp28→Gly, Asp28→Ala, Leu59→Val, Glu61→Asp, Ala63→Pro and Ile66→Met, have been identified in the subunit c forming a c-ring in the ATP synthase. They were studied by evaluating the levels of resistance they confer in the selected clones and in *Mycobacterium smegmatis* by using an isogenic complementation system. The rates of increase of TMC207 MIC values (8- to 133-fold) were interpreted by constructing by homology modeling a structure of the mycobacterial c-ring which was used for docking simulations with TMC207. Our results suggest that the residues found to be mutated in the resistant clones, together with a tyrosine specifically conserved at position 64 in mycobacteria, define a cleft located between two adjacent c subunits in the c-ring. This cleft, which encompasses the proton binding site (Glu61), is well fitted to bind TMC207 at the level of the bromo-quinoline moiety, the drug being anchored by several ionic, hydrogen and halogen bonds with residues Glu61, Tyr64 and Asp28, respectively. These data shed light on the molecular interactions allowing TMC207 to bind specifically and efficiently at the level of the proton binding site of the mycobacterial c-ring.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is a major cause of death from infectious disease, with more than 9 million incident cases and 1.3 million deaths in 2009, making TB a global public health issue. Because TB therapy is long, complex and significantly hampered by the growing development of both multidrug-resistant TB (MDR) and extensively drug resistant TB (XDR), the current antituberculosis arsenal is more and more compromised and new drugs acting against new targets are urgently required.

The diarylquinoline TMC207 (previously R207910, Figure 1) is a very promising candidate drug for treatment of TB and mycobacterial infections (Andries, Verhasselt et al. 2005), currently in phase IIb clinical trials for patients with multidrug-resistant tuberculosis (Diacon, Pym et al. 2009). TMC207 targets ATP synthase with a range of activity specifically restricted to mycobacteria, with no significant activity against other bacteria (Andries, Verhasselt et al. 2005) nor against eukaryotic cells (Haagsma, Abdillahi-Ibrahim et al. 2009). The activity spectrum of TMC207 includes the mycobacterial species that are pathogenic to humans such as *Mycobacterium tuberculosis*, but also atypical pathogenic species such as *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii*, and the fast growers *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium abscessus* (Andries, Verhasselt et al. 2005).

F-type ATP synthase, an ubiquitous enzyme in eukaryotic and prokaryotic cells, utilizes the energy stored in an H^+ or Na^+ electrochemical gradient to synthesize ATP (Yoshida, Muneyuki et al. 2001; Capaldi and Aggeler 2002; Dimroth, von Ballmoos et al. 2006; von Ballmoos, Cook et al. 2008). The ATP synthase complex is composed of two sectors, *i.e.* a water-soluble sector (F_1) that is bound to a membrane-embedded sector (F_O). In bacteria, F_1 is composed of five subunits with an $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ stoichiometry and contains three catalytic sites for ATP synthesis and/or hydrolysis in the α/β interface. F_O is formed by three subunits with an $ab_2c_{8\text{-}15}$ stoichiometry and functions as an ion-conducting pathway (Stock, Leslie et al. 1999; Jiang, Hermolin et al. 2001; Mitome, Suzuki et al. 2004; Meier, Polzer et al. 2005; Pogoryelov, Yildiz et al. 2009; Dautant, Velours et al. 2010; Watt, Montgomery et al. 2010). Ion translocation through F_O drives rotation of a cylindrical ring of subunits c that is coupled to rotation of the subunit γ within the $\alpha_3\beta_3$ hexamer of F_1, a rotation that drives synthesis of ATP (Boyer 1989; Abrahams, Leslie et al. 1994; Noji, Yasuda et al. 1997; Yoshida, Muneyuki et al. 2001; Capaldi and Aggeler 2002; Dimroth, von Ballmoos et al. 2006; von Ballmoos, Cook et al. 2008; von Ballmoos, Wiedenmann et al. 2009). Subunit c is a hairpin

structure comprising two membrane-spanning α helices connected by a hydrophilic loop at the cytoplasmic side of the membrane (Meier, Polzer et al. 2005). This subunit is known to form an oligomeric ring, the stoichiometry of which varies between 10 and 15 depending on the species (von Ballmoos, Wiedenmann et al. 2009). Subunit a, composed of five transmembrane helices (Vik and Ishmukhametov 2005), interacts with subunit c at the periphery of the c-ring, forming the a-c interface (Angevine, Herold et al. 2007). The essential residue Arg210 (*E. coli* numbering) of subunit a is postulated to facilitate the protonation/deprotonation cycle of the proton carrier Asp or Glu of subunit c and contributes to the rotation of the c-ring during ion translocation through F_O (Dimroth, von Ballmoos et al. 2006; von Ballmoos, Cook et al. 2008; Steed and Fillingame 2009).

TMC207 targets the c-ring of ATP synthase, as suggested by the identification of mutants of *M. tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* resistant to the drug and having mutations in subunit c at positions 28 (Asp→ Gly/Val/Pro), 61 (Glu→ Asp), 63 (Ala→ Pro) and 66 (Ile→ Met) in the *M. tuberculosis* amino acids numbering system (Andries, Verhasselt et al. 2005; Petrella, Cambau et al. 2006; Huitric, Verhasselt et al. 2010). The hypothesis is further supported by the fact that the mycobacterial species naturally resistant to TMC207, i.e. *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium novacastrense* and *Mycobacterium shimoidei*, display a Met at position 63 in subunit c in place of a conserved Ala in the species susceptible to the drug (Petrella, Cambau et al. 2006; Huitric, Verhasselt et al. 2007).

No crystal structure information is available to date on the mycobacterial c-ring. The five crystal structures of c-rings available in the Protein Data Bank (PDB) for F-type ATP synthases are the structures of *Ilyobacter tartaricus* (11 subunits c, PDB = 2WGM) (Meier, Krah et al. 2009), spinach chloroplast (14 subunits c, PDB 2W5J) (Vollmar, Schlieper et al. 2009), the cyanobacterium *Spirulina platensis* (15 subunits c, PDB 2WIE) (Pogoryelov, Yildiz et al. 2009), *Bacillus pseudofirmus* OF4 (13 subunits c, PDB 2X2V) (Preiss, Yildiz et al.) and of yeast (10 subunits c, PDB 2WPD) (Dautant, Velours et al. 2010). These c-ring structures are Na^+ (*I. tartaricus*) or H^+ (spinach chloroplast, *S. platensis*, *B. pseudofirmus,* yeast) -binding ATP synthases. Despite the fact that the amino acid composition of the c subunits in ATP synthases is significantly variable (Figure 2), these structures present common features related to the binding of the H^+/Na^+ ion . In the two structures representative of bacterial ATP synthases (*S. platensis* and *I. tartaricus*), each ion binding-site lies in between two adjacent c subunits, and the conserved glutamate residue (Glu65 in *I. tartaricus*, Glu62 in *S. platensis*, corresponding to Glu61 in *M. tuberculosis*) (Figure 3) provides the main stabilizing interaction for the H^+/Na^+ ion which is also stabilized by another interaction with the side chain of a glutamine residue from the same subunit (Gln32 in *I. tartaricus*, Gln29 in *S. platensis*, corresponding to Asp28 in *M. tuberculosis,* carried by monomer B on Figure 3). The backbone carbonyl oxygen atom of a residue hold on by a neighbouring subunit facing the conserved glutamate (Val63 in *I. tartaricus*, Phe60 in *S. platensis*, corresponding to Leu59 in *M. tuberculosis*, carried by monomer A on Figure 3) also contributes to stabilize the ion (see Figure 3A and 3B). Furthermore, the conserved glutamate residue establishes a hydrogen bond with the hydroxyl group of a tyrosine residue (Tyr70 in *I. tartaricus,* Tyr67 in *S. platensis,* corresponding to Tyr64 in *M. tuberculosis*) (Figure 3). These intramolecular interactions represent a common mode of ion binding in the c-rings of several bacterial species, as weel as of cyanobacteria and chloroplasts (Krah, Pogoryelov et al.).

Here we report the isolation of TMC207-resistant mutants obtained (i) from *M. tuberculosis* H37Rv and three *M. tuberculosis* clinical strains, (ii) from *M. smegmatis* and, (iii) for the first time, from two other atypical mycobacteria which can cause diseases in humans: *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium fortuitum*. Six different amino acid mutations implicated in TMC207 resistance were identified, three of them having never been observed previously. The level of resistance conferred by these mutations was evaluated by determining the MICs of the mutated strains as well as those of a *M. smegmatis* wild strain complemented with the mutated genes. Finally, by using the crystal structures of the homologous c-ring of *S. platensis* (Pogoryelov, Yildiz et al. 2009), a model structure of the c-ring of *M. tuberculosis* was built and used to predict the binding site of TMC207 on the c-ring and the interactions the drug could establish with its target.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, culture media and antibiotics

M. tuberculosis H37Rv and *M. smegmatis* mc^2155 were used as reference strains. The other strains of *M. tuberculosis*, *M. abscessus* and *M. fortuitum* were clinical isolates from our laboratory collection. *M. smegmatis* was cultured in Brain Heart Infusion (BHI) medium (Difco) with 0.5% Tween-80 (Sigma) at 37°C with shaking. The other species were cultured in Middlebrook 7H9 medium (Difco) supplemented with 10% OADC (oleic acid –albumin-dextrose-catalase Middlebrook) at 37°C for *M. tuberculosis* and 30°C for atypical mycobacteria. When required, the media were supplemented with 100 mg/L of zeocin (Invitrogen). *E. coli* TOP10 was used as host for plasmid transformation experiments. The cultures were incubated at 37°C in BHI medium supplemented with 25 mg/L of zeocin.

The diarylquinoline TMC207 was provided by Johnson & Johnson Pharmaceutical Research and Development.

Determination of Minimal Inhibition Concentrations (MICs) of TMC207 against *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacterial species

MICs were determined on 7H11 agar supplemented with 10% OADC containing serial two-fold dilutions of TMC207, ranging from 0.0007 to 64 mg/L. Plates were incubated at 30°C or 37°C for 3-42 days (depending on the mycobacterial species). The MIC values of the *M. smegmatis* strains complemented by the wild type and the mutated *atpE* genes were determined on BHI-Tween80 agar supplemented with zeocin and containing growing concentrations of TMC207 varying from 0.0007 to 32 mg/L. Plates were incubated at 37°C for 5 days.

Isolation of resistant mutants and characterization of the mutations

For atypical mycobacteria, a 3 days culture of 4 ml of BHI-Tween80 medium was inoculated in 300 ml of the same medium for *M. smegmatis* and of 7H9-OADC medium for *M. fortuitum* and *M. abscessus*. After 3 days, these cultures were used as inoculum either directly (containing approximately 10^9 to 10^{10} CFU/ml) or after 10- to 100-fold concentration of the cells by centrifugation. 100 µl of each inoculum was spread onto BHI-Tween80 or 7H9-OADC agar containing different concentrations of TMC207 varying from 0.003 mg/L to 1 mg/L for *M. smegmatis* (MIC = 0.007 mg/L), 0.015 mg/L to 0.5 mg/L for *M. fortuitum* (MIC = 0.01 mg/L), and 0.25 mg/L to 8 mg/L for *M. abscessus* (MIC = 0.25 mg/L). Cultures were incubated at 30°C for three days.

For *M. tuberculosis*, the strains were grown for one week without shaking at 37°C in 15 ml of Dubos-OADC medium. This culture was used to inoculate 300 ml of Dubos-OADC medium. After 7 days of growth, 100 µl of the culture was spread, directly or after concentration by a factor 10 or 100, onto 7H11-OADC agar containing six concentrations of TMC207 varying from 0.03 mg/L to 0.5 mg/L (MIC = 0.015-0,06 mg/L). Cultures were incubated at 37°C for six weeks.

The DNA of the mutants growing on the different concentrations of TMC207 was extracted by heat shock from a cell suspension by five alternate cycles of 1 min incubation in boiling water and 1 min on ice. DNA amplification of the *atpE* gene coding for the ATP synthase subunit c was carried out using the degenerated primers atpBS and atpFAS (Table 1), as previously described (Petrella, Cambau et al. 2006). The *atpB* gene coding for the subunit a of ATP synthase of *M. tuberculosis* and *M. abscessus* was amplified with the primers atpBBKS and atpBBKAS, and atpBABS_S and atpEABS_AS, respectively (Table 1). The entire ATP synthase operon was amplified with 8 primers pairs from three clones of *M. tuberculosis*: opeatpBKS1/atpBBKAS, atpEBKLYGS/opeatpBKAS2, opeatpBKS3/opeatpBKAS4, opeatpBKS5/opeatpBKAS6, opeatpBKS7/opeatpBKAS8, opeatpBKS9/opeatpBKAS10, opeatpBKS11/opeatpBKAS12, and opeatpBKS13/opeatpBKAS14 (Table 1). Each pair allows amplification of about 1000 pb in the ATP synthase operon. All the PCR products were sequenced and compared with the wild type genes to find mutations.

Complementation assay

The wild type *atpE* gene of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* were amplified by PCR with the primers atpEsmeLYGE and atpEsmeLYGS, and atpEBKLYGE and atpEBKLYGS, respectively (Table 1). The amplified genes were directly inserted in the pMOSBlue vector using the pMOSBlue Blunt Ended Cloning Kit (Amersham Biosciences). The recombinant vectors obtained were digested with *Eco*RI and *Sma*I to generate an insert compatible with the pLYG204.zeo plasmid (Gao, Groger et al. 2003) digested with enzymes *Eco*RI and *Msc*I. After ligation, the recombinant pLYG204 vectors containing the *atpE* genes (pLYG-*atpE*sme for *atpE* from *M. smegmatis* and pLYG-*atpE*BK for *atpE* from *M. tuberculosis*) were introduced by transformation in *E. coli* TOP10. Electropored cells were preincubated in LB medium for one hour at 37°C before being plated on BHI agar supplemented with zeocin (25 mg/ml) and grown for one day at 37°C. Presence of the recombinant vector in the colonies was checked by PCR and DNA sequencing using the primers pLYG204 and atpEsmeLYGE for *M. smegmatis* or atpEBKLYGE for *M. tuberculosis* (Table 1).

Point mutations were introduced in the pLYG204 recombinant vectors containing the *atpE* genes of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* by using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). The mutagenic primers (Tables 1) were designed from the sequence of the *atpE* wild type gene. The mutated pLYGatpE plasmids were prepared from *E. coli* TOP10 transformants before being introduced by electroporation in *M. smegmatis* mc^2155. After 2 hours of culture at 37°C in BHI-Tween80 medium, the *M. smegmatis* transformants were plated on BHI-Tween80 agar supplemented with zeocin and grown at 37°C for four days.

Southern blot hybridization

Genomic DNA was extracted from *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* as previously described (Petrella, Clermont et al. 2001), except that *M. tuberculosis* DNA was extracted with chloroform-isoamylalcohol and *N*-cetyl-*N*,*N*,*N*-trimethylammonium bromide (SIGMA). Enzyme digestions were performed with *Pst*I and *Bst*EII for *M. smegmatis* DNA, and with *Msc*I and *Nco*I for *M. tuberculosis* DNA. The restriction fragments were separated by electrophoresis on 1% agarose gel at 100V for 15 min, then at 40V for 15h. Southern blot hybridizations were performed as previously described (Petrella, Clermont et al. 2001) using as probes the amplified *atpE* genes of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*.

Construction of the model structures of the c-ring of *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*, and docking simulations

The models of the c-rings of the ATP synthases of *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* were built by homology modeling from the AtpE amino acid sequences of H37Rv and mc2155, respectively, using the software MODELLER (Eswar, Webb et al. 2006) and the crystal structure of the c subunit of *S. platensis* as template. The entire structure of the c-ring was obtained using Secondary Structure Matching algorithm from Coot (Emsley and Cowtan 2004). The structures obtained were energy-minimized in 100 steps using the program CNS (Brunger 1998).

The TMC207 structure was constructed using the module Modeller in Insight II (Accelrys). Hydrogen atoms were added and the molecule was energy minimized using the CHARMM program and the force field PARAM22. The ligand was docked into the c-ring structure using the AUTODOCK program (version 4) (Morris, Goodsell et al. 1998). The grid of the docking simulation was defined by a 40 x 40 x 40 Å cube centred at a position located in the vicinity of the Glu61 residue within the binding site. The docking simulations were performed using a Lamarckian genetic algorithm search routine whose parameters were set using the Autodock Tools (ADT): in total, 150 runs were made, with a population size of 250 and 25 million energy evaluations. The best protein-ligand docked complexes were selected based on various parameters: Autodock clustering scenario (root mean square based), Autodock Intermolecular Energy and, most importantly, the reasonableness of the interactions between the ligand and the protein.

RESULTS

Selection of mutants

Mutants of *M. tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. abscessus* and *M. smegmatis* resistant to TMC207 were selected in vitro on various concentrations of the drug. The presence of mutations in the subunit c was searched for by amplifying and determining the nucleotide sequence of the *atpE* gene and the 78 bp upstream and 121 bp downstream regions, using the degenerated primers atpBS and atpFAS (Table 1) (Petrella, Cambau et al. 2006). As shown in Table 2, the mutation frequencies varied from 10^{-8} to 5.10^{-8} whatever was the species considered. Among the mutants obtained, the number of TMC207 resistant colonies showing a mutation in *atpE* varied according to the strains used for selection. In *M. tuberculosis* and *M. abscessus*, the ratio of strains showing a mutation relative to the total number of clones tested ranged from 16 to 83%. In the two atypical species *M. fortuitum* and *M. smegmatis*, 100% of the mutants had a mutation in AtpE (Table 2).

The 4/25 mutants obtained for *M. tuberculosis* H37Rv which had an amino acid substitution in AtpE, exhibited the same mutation, Ala63→Pro. By contrast, a higher diversity of mutations was observed in the 23 mutants obtained from the *M. tuberculosis* clinical isolates, with 5 different amino acid substitutions: Asp28→Gly, Leu59→Val, Glu61→Asp, Ala63→Pro and Ile66→Met (Table 2). Regarding the mutants selected from atypical mycobacteria, a single type of mutation was detected in the 9 mutants of *M. fortuitum* (Asp28→Ala) and the 8 mutants of *M. smegmatis* (Ile66→Met), and two types in the 8 mutants of *M. abscessus* (Asp28→Ala in 7 clones and Ala28→Pro in one clone).

The MIC values of TMC207 for the mutant strains and for the corresponding wild type mycobacterial species are given on Table 2. Whatever was the concentration of TMC207 used in the selection, the mutants harbouring the same mutation in a given species displayed identical MIC values. The highest MIC values were observed in *M. tuberculosis* mutants having the Ala63→Pro mutation (MIC = 4 mg/L, 133-fold higher than the MIC of the wild type strain H37Rv). The *M. tuberculosis* mutants carrying the mutations Glu61→Asp, Ile66→Met and Asp28→Gly had MIC values varying from 0.5 to 1 mg/L, i.e. 16- to 33-fold higher compared to H37Rv. The lowest MIC value was measured for the *M. tuberculosis* mutant having the mutation Leu59→Val (MIC = 0.25 mg/L, 8-fold increase). Regarding the mutants selected from atypical mycobacteria, the MIC values ranged from 4 to 16 mg/L, with a noticeable 400-fold increase for the *M. fortuitum* mutants carrying Asp28→Ala, when compared to the *M. abscessus* mutants carrying the same mutation (32-fold increase). The two other mutations, Ala63→Pro in *M. abscessus* and Ile66→Met in *M. smegmatis* raised the MIC values by 64- and 133-fold, respectively.

Concerning the 29 *M. tuberculosis* colonies selected on TMC207 which had no mutation in *atpE*, southern hybridization and DNA amplification and sequencing were used to seek out other possible resistance mechanisms. We first checked by southern hybridization analysis that only one copy of *atpE* was present on the chromosome. Using *Msc*I- and *Nco*I-digested chromosomal DNA fragments of *M. tuberculosis*, an *atpE* probe was found to hybridize to a single *Msc*I fragment of approximately 1200 pb and to a single *Nco*I fragment, of approximately 3670 pb, respectively (data not shown), indicating that there is only one copy of this gene in the *M. tuberculosis* genome. Considering the previously proposed hypothesis suggesting that the drug could bind at the interface formed between the a- and c-subunits (de Jonge, Koymans et al. 2007), the presence of mutations in the subunit a encoded by *atpB* in the 29 *M. tuberculosis* and the 9 *M. abscessus* mutants displaying resistance to TMC207 without mutation in *atpE* was searched for by determining the nucleotide sequence of *atpB* in all the mutants. We also assessed if mutations could be present in the other ATP synthase subunits by amplifying and sequencing the entire ATP synthase operon in three *M. tuberculosis* strains: the reference strain H37Rv, a TMC207-resistant mutant carrying a mutation in *atpE* and a resistant mutant without mutation in *atpE*, selected on 0.5 mg/L of TMC207. In all cases, the comparison of the nucleotide sequences obtained showed that no mutation was present in the *atpB* gene, nor in any of the other genes of the ATP synthase operon (data not shown).

Complementation experiments

To further investigate the role played by the different mutations found in the mutants resistant to TMC207, a method of gene complementation was developed to assess the level of TMC207 resistance they are capable to confer in an isogenic context. This was achieved by introducing in *M. smegmatis* a plasmid carrying the *atpE* gene of *M. smegmatis* harboring the

mutations found in all the species included in this study or, alternatively, the *atpE* gene of *M. tuberculosis* harboring the mutations found in the *M. tuberculosis* mutants.

As shown in Table 3, the four control strains, i.e. *M. smegmatis* mc^2155, the strain complemented with pLYG204 without insert, and the strains of *M. smegmatis* complemented with pLYG-*atpE*sme^{Wt} and pLYG-*atpE*BK^{Wt} all displayed the same MIC value (0.12 mg/L). The *M. smegmatis* strains complemented with the *atpE* gene expressing the *M. smegmatis* subunit c containing the mutations Asp28→Val, Asp28→Ala or Asp28→Gly showed a high level of resistance, with MIC values of 16 mg/L (a 133-fold increase when compared to the control strains). The *M. smegmatis* strains expressing the subunit c with the mutations Glu61→Asp and Ile66→Met also showed significant increase in the level of resistance to the drug with MICs of 4 and 8 ml/L, respectively (33- to 66-fold higher than the MICs of the control strains). Finally, the complementation of *M. smegmatis* with the *M. smegmatis atpE* gene expressing a subunit c containing the mutations Leu59→Val, Ala63→Met or Ala63→Pro, resulted in a 4-fold increase of the MIC values (MIC = 0.5 mg/L, compared to 0.12 mg/L for the control strains).

Unexpectedly, when the *atpE* gene of *M. tuberculosis* harboring the mutations identified in this specie (Asp28→Gly, Leu59→Val, Glu61→Asp, Ala63→Pro and Ile66→Met) was introduced in *M. smegmatis*, the complemented bacteria showed a susceptible phenotype with MIC values equal to that of the control strains (MIC = 0.12 mg/L, see Table 3).

c-ring models of *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*

The c-ring models of *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* were built by homology modelling using the c-ring structure coordinates of the H^+-ATP synthase of *S. platensis* which shares 30% sequence identity with the amino acid sequences of the mycobacterial c subunit. As expected from the very high sequence identity found between *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*, the models of the c-rings from the two mycobacterial species displayed very similar shapes (Figure 4A and 4B), the only significant structural difference being located in the N-terminal region where 4 additional amino acids are found in *M. smegmatis* when compared to *M. tuberculosis,* leading to an additional long tail extending toward the periplasm in *M. smegmatis* (visible on Figure 2 and 4A). Another significant difference was observed at the level of the C-terminal residue where a positively charged Lys is found in *M. tuberculosis* instead of Gln in *M. smegmatis* (see Figure 2). The four other amino acid differences found between *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* (A/T6 A/G18, V/I30, V/I39) (Figure 2) are scattered throughout the sequence of the c subunit and do not lead to significant structural differences in the c-ring models of *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* (data not shown).

A detailed view of the region of the conserved residue Glu61 in the c-ring model of the mycobacterial ATP synthase is given on Figure 3C. As expected, the side chain of Glu61, which is carried by the C-terminal helix of a given monomer in the c-ring (monomer B [C-ter] in Figure 3C), protrudes above the N-terminal helix of the same monomer (monomer B [N-ter]), the carboxylate group pointing toward the residues of the C-terminal helix of a neighbouring monomer (monomer A [C-ter] in Figure 3C). Strikingly, when compared to the structures of the c-ring from *I. tartaricus* and *S. platensis* which both have a tyrosine residue pointing toward the carboxylate moiety of the conserved glutamate (Tyr70 and Tyr67 on Figures 3A and 3B, respectively), the mycobacterial c-ring possesses a tyrosine residue in position 64 that would be the residue equivalent to Tyr70 and Tyr67 in the two former species (Figure 3). Therefore, for a given proton-binding site, the side chains of Glu61 and Tyr64 in mycobacteria are held by the same polypeptide chain (monomer B [C-ter] in Figure 3C) and are both oriented in the same direction, while in *I. tartaricus* and *S. platensis*, the corresponding side chains (Glu65/62 and Tyr70/67) are carried by two different monomers (monomer B [C-ter] for Glu and monomer A [C-ter] for Tyr) with opposite orientations, the oxygen atom of the tyrosinate being located close to the oxygen atom of the carboxylate moiety (Figure 3A and 3B). Despite these differences, the special location of the tyrosinate moiety in the three cavity models is globally similar (see Figure 3).

It must be pointed out here that most of the residues located around Glu61 in *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* are those that are involved in resistance to TMC207: Asp28 which is carried by the monomer holding the side chain of Glu61 in a given proton-binding site (monomer B in Figure 3C), and Leu59, Ala63 and Ile66 which come from a neighbouring monomer (monomer A in Figure 3C). When compared to the *S. platensis* 3D structure (Figure 3B), the specific presence of these residues in the c subunit model of *M. tuberculosis* significantly increases the room around the glutamate residue at position 61 (Figure 3C) which could allow the formation of a cleft delimited by residues Leu59, Glu61, Ala63, Tyr64 and Ile66 at its entrance, and Asp28 at its bottom. Among these residues, Ala63 and Asp28 which are specifically found in the mycobacterial c subunit

instead of Leu64 and Gln29 in *S. platensis*, have the greatest contribution to the formation of a cleft at the level of Glu61 in the mycobacterial c-ring (see Figure 3B and 3C).

Docking of TMC207

The coordinates of the wild-type *M. tuberculosis* c-ring model was used for docking simulations with TMC207 (RS stereoisomer, see Figure 1). The binding site for docking was centered on the amino acid Glu61 and the solutions obtained were clustered according to the root-mean-square criterion. The best docking solution, which is detailed on Figure 5, was extracted from the cluster containing the highest number of equivalent solutions displaying the lowest value of estimated free energy binding (-8.89 kcal/mol). According to this mode of docking, the TMC207 molecule would be anchored at the level of the quinoline ring into the cleft delimited by Asp28, Glu61 and Tyr64 on one side (carried by monomer B on Figure 5), and Leu59, Ala63 and Ile66 on the other side (carried by monomer A on Figure 5), the drug being stabilizes by 3 distinct types of interactions: (i) a hydrogen bond and a salt bridge linking Glu61 to TMC207 at the level of the hydroxyl and the dimethylamino groups of the drug, respectively; (ii) a hydrogen bond between the hydroxyl group of Tyr64 and the methyloxy moiety of the drug, and (iii) a halogen bond between the electronegative brome atom of TMC207 and the residue Asp28 buried at the bottom of the pocket (Figure 5). In this conformation, the naphtyl and phenyl rings of TMC207 protrude at the external surface of the c-ring (see Figure 5) and would be, in this way, stabilized by hydrophobic interactions with the lipid bilayer surrounding the α-helices of the c-ring.

DISCUSSION

With the goal to extend our understanding of the binding of TMC207 to the mycobacterial ATP synthase, we selected *in vitro* several independent and spontaneous TMC207-resistant mutants from various mycobacterial species, including the human pathogens *M. tuberculosis*, *M. abscessus* and *M. fortuitum*, and interpreted the effect of the mutations by generating by homology modeling a structural model of the TMC207 binding site in the c-ring of the mycobacterial ATP synthase.

Whatever was the mycobacterial species used, TMC207 resistant mutants were obtained with an apparent rate of mutation varying from 10^{-8} to 5.10^{-8}, a value comparable to the mutation rates previously reported for isoniazid and rifampicin (David 1970; Werngren and Hoffner 2003; Johnson, Streicher et al. 2006). Strikingly, 38 of the 82 mutants (46%) obtained from *M. tuberculosis* and *M. abscessus* displayed no mutation in the *atpE* gene. These mutants were selected on low concentrations of TMC207 (i.e. 2- to 8-fold the wild type MIC value). Considering the hypothesis made by De Jonge et al. (de Jonge, Koymans et al. 2007) who previously suggested that the compound is embedded at the level of the a- and c-subunits interface, we sequenced *atpB* in the 82 mutants but found no mutation in the gene encoding the a subunit. These results confirmed those previously reported by Huitric et al. (Huitric, Verhasselt et al. 2010) who reported the absence of mutation in the subunit a of TMC207-resistant clones. Altogether, these results strongly suggest that the drug binds primarily at the level of the grooves formed between adjacent c subunits in the c-ring rather than at the interface between the a and the c subunits. Conversely, mutations in both subunits a and c were identified from resistant mutants of drugs such as oligomycin and mefloquinone that block H+ translocation in the mitochondrial and the *S. pneumoniae* ATP synthases by interacting with the enzyme at the level of the a-c interface (Devenish, Prescott et al. 2000; Martin-Galiano, Gorgojo et al. 2002). Finally, it is noticeable that for one of the 38 resistant clones without mutation in *atpE* and *atpB*, selected on 0.5 mg/L of TMC207, the 8 sequences of the genes encoding the complete ATP synthase operon (F_O and F_1 domains) were all found to be wild-type when compared to the reference sequence of the ATP synthase operon of H37Rv, highlighting that mechanisms not related to the acquisition of mutations in the ATP synthase operon can also contribute to resistance to TMC207 in *M. tuberculosis* and *M. abscessus.*

With regard to the TMC207-resistant mutants showing amino acid substitutions in the c subunit, it must be stressed out that the diversity of the mutations selected from the 3 clinical strains of *M. tuberculosis* (strain P, D, and LQ, see Table 2) and, to a lesser extent, from the clinical strain V of *M. abscessus*, is markedly higher than that observed in the clinical strain B of *M. fortuitum* and in the two laboratory strains *M. tuberculosis* H37Rv and *M. smegmatis* mc^2155 (Table 2). Indeed, while only a single type of mutation was found from *M. tuberculosis* H37Rv, *M. fortuitum* B and *M. smegmatis* mc^2155, 5 different mutations were selected from the three clinical isolates P, D, and LQ of *M. tuberculosis*, and 2 from *M. abscessus* strain V. It is tempting to relate this observation to the possible presence in the strains of clinical origin, and particularly in *M. tuberculosis*, of mutator mechanisms resulting in an increased mutation diversity (Chang, Lin et al.).

The effect of the mutations selected in the mutants obtained *in vitro* was assessed (i) by determining the MICs of TMC207 for the various mutants, (ii) by evaluating the effect of the mutations in an isogenic complementation assay and (iii) by analyzing the structural modifications induced by the mutations in a 3D model of the mycobacterial c-ring. Regarding the results obtained in the complementation assay, a striking observation is the absence of complementation observed when the mutated c subunits of *M. tuberculosis* were introduced in *M. smegmatis*, whatever was the mutation harbored by the c subunit (see Table 3). Considering the very high similarity between the amino acid sequences of the c subunits of *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* (85%), it is very likely that the absence of variation of MIC values observed when the *M. tuberculosis* c subunits are expressed in *M. smegmatis* is linked to the specific N- and C-terminal sequences characterizing the former species (MDPT and VK, respectively) when compared to the latter (MDLDPNAI and GLQ, respectively). Assuming that such sequences are essential to stabilize the c-subunits at the level of the external part of the lipid bilayer, it can be hypothesized that the insertion of the *M. tuberculosis* c subunit into the *M. smegmatis* membrane is unfavorable because of the absence of acidic N-terminal tail characterizing the *M. smegmatis* c subunit, as well as the presence of a positively-charged lysine residue at the C-terminal part in the *M. tuberculosis* c subunit.

Before addressing in detail the structural and phenotypic effects of the mutations, it is worth mentioning here that the 3D organization of the proton-binding site at the level of residue Glu61 in *M. tuberculosis* and *M. smegmatis*, when compared to the structure model of *S. platensis*, presents a striking difference in the positioning of the essential tyrosine residue which is located at position 64 in the mycobacterial c-ring and corresponds to the Tyr67 residue forming a H-bond interaction with Glu62 in *S. platensis*. The absence of Tyr at position 66 in the mycobacterial ATP synthase, combined with the specific presence of Asp28 and Ala63 instead of Gln and Leu in *S. platensis,* respectively, significantly enlarge the groove found at the level of Glu61 between two adjacent c subunits in the mycobacterial c-ring (see Figure 3B and 3C), thus generating a pocket the size of which may be large enough to accommodate the diarylquinolines (Figure 5). Accordingly, the modelization of the substitutions Leu64→Ala and Gln29→Asp in the crystal structure of *S. platensis* leads to the formation of large cavities around Glu62 at the level of the two C-terminal helices circumscribing the proton-binding site, the substitution of Tyr67 into Ile further expanding the cleft to open it toward the outside of the ring (data not shown). Docking simulations of TMC207 to a minimized 3D model of the mycobacterial c-ring indicate that the putative pocket could accommodate the bromo-quinoline moiety of the drug which would be stabilized by 3 different types of interactions: (i) 2 H-bonds with the side chains of Glu61 and Tyr64, respectively, (ii) a salt bridge with the carboxylate moiety of Glu61 and (iii) a halogen bond between the Br atom of the drug and the side chain of Asp28 (Figure 5). Previous studies have suggested that TMC207 most likely interfere with proton transfer by interacting with the mycobacterial c-subunit at the level of a binding niche including Glu61 (de Jonge, Koymans et al. 2007; Haagsma, Podasca et al. 2011). This model is corroborated by our results that demonstrated that there is a nearly perfect correspondence between the amino acid residues defining the proton-binding cavity in the ATP synthase c-ring on one hand, and those found to be mutated in TMC207-resistant mutants, on the other, which define the binding pocket around the drug (i.e. Leu59, Glu61, Ala63 and Ile66 on the

edge of the pocket, and Asp28 at the level of the ground of the pocket). The fact that Tyr64 has never been found mutated in TMC207-resistant mutants is probably due to the essential role this residue plays in the integrity and functionality of the proton-binding pocket.

The mutation Ala63→Pro in the mycobacterial c-subunit is the amino acid modification displaying the highest effect among the mutants selected *in vitro* on TMC207, with a MIC value of the drug increased by 133-fold in the 7 *M. tuberculosis* clones and by 64-fold in the single *M. abscessus* clone harboring this mutation. This result is readily explained by the fact that proline residues act as structural disruptors when they are introduced in the middle of an alpha helix, which is the case in this study since the mutation Ala63→Pro occurs in the middle of the C-terminal helix of subunit c (monomer A [C-ter] on Figure 3C), with significant consequences for the binding of the drug in the groove delimited by two adjacent C-terminal helices in the c-ring (see Figure 5). The modifications induces by Pro63 may also account for the fact that the mutation Ala63→Pro in the complementation assay induced only moderate level of resistance (4-fold increase of the TMC207 MIC) when compared to the 133-fold increase of the MIC value observed in the *M. tuberculosis* mutants. This could be related not only to a significant alteration in the geometry of the alpha helix carrying Pro63, but also to the alteration of the folding of the c-subunits containing the mutation, which are encoded by the mutated *atpE* genes brought by the plasmid, that would be therefore incorporated in the c-ring less efficiently that the wild-type c subunit determined by the chromosomal copy of the *atpE* gene. One has to note that Ala63, which is highly conserved in the mycobacterial species susceptible to TMC207, is naturally replaced by a Met residue in the 3 mycobacteria known to display intrinsic resistance to the drug, i.e. *M. xenopi*, *M. novacastrense* and *M. shimoidei* (Petrella, Cambau et al. 2006), reinforcing the idea that Ala63 plays a key role in the development of resistance to TMC207.

Asp28 is the residue showing the highest degree of diversity in the TMC207-resistant mutants. Two new mutations (Asp28→Gly and Asp28→Ala) were identified in our study beyond those previously reported in other studies (Asp28→Val or Pro) (Andries, Verhasselt et al. 2005; Huitric, Verhasselt et al. 2010). These mutations conferred marked increase in the MIC values of TMC207, whatever the species in which they occurred (16- to 400-fold increase, see Table 2). In the *in vitro* complementation assay, the 3 tested mutations (Asp28Val, Ala and Gly) were those displaying the most marked effects, with a 133-fold increase of the level of resistance observed for the 3 substitutions. This indicates that the increase of TMC207 resistance level in the Asp28 mutants is more related to the loss of the carboxylic moiety of Asp28 than to the variations of steric hindrance linked to the substitution. The docking study carried out from the *M. tuberculosis* c-ring model strongly support the hypothesis of a binding site accepting the quinoline ring, the anchoring of the drug being ensured by a halogen bond between the bromine atom and the carboxylate of Asp28 (Figure 5). Interestingly, a recent report of Guillemont and colleagues on the QSAR of diarylquinolines series has highlighted that omitting the bromine atom in the 6-portion of the quinoline ring was highly deleterious to the antimycobacterial activity of the drug (Guillemont, Meyer et al. 2011). This observation reinforces the possible contribution of a halogen bond to the binding of TMC207 on the mycobacterial c-subunit. It is of note that none of the species identified by Andries et al. (Andries, Verhasselt et al. 2005) to be naturally resistant to TMC207 have an aspartate residue at the equivalent position 28 in the c-subunit, such as *Escherichia coli* (Ile28, MIC > 32 mg/L) or *Corynebacterium jeikeium* (Val28, MIC = 4 mg/L).

As previously mentioned, Glu61 functions as proton carrier in the H^+-ATP synthases and represents an essential amino acid for the functionality of the enzyme. Therefore, the only amino acid replacement tolerated at this position corresponds to the mutation Glu61→Asp which preserves the carboxylate group at the extremity of the side chain. In our study, this mutation occurred in 5 TMC207-resistant colonies for which the level of resistance was increased by 16- to 33-fold in the *in vitro* mutants, a 4-fold increase being observed in the complementation assay. These effects are very likely related to the shortening of the side chain carrying the carboxylate moiety which is crucial for the anchoring of the drug by providing two bonding interactions with the hydroxyl (H-bond) and the dimethylamino (ionic bond) groups of TMC207 (see Figure 5). This

hypothesis is supported by previous reports mentioning (i) that the replacement of the dimethylamino group with non-basic functionality or, alternatively, the shortening or the lengthening of the lateral chain carrying this group significantly alter the activity of the drug (Guillemont, Meyer et al. 2011) and (ii) that electrostatic forces are an important factor for binding of TMC207 to the subunit c of the mycobacterial ATP synthase (Haagsma, Podasca et al. 2011).

The replacement of Ile by Met at position 66 introduces a bulky side chain carrying a sulfur atom at the level of the TMC207-binding site, resulting in an increase of the MIC values of TMC207 comparable to those induced by Glu61→Asp. This effect was observed in our *in vitro* mutants and in our complementation assay as well. Considering the orientation of the side chain of residue 66, it is likely that the presence of Met66 induces significant steric clashes between the sulfur containing group of the residue and the tyrosinate moiety of Tyr64 (see Figure 5). Two possible consequences of these steric effects could be an altered fit of the quinoline moiety between two C-terminal helices, and a disruption of the H-bond linking the hydroxyl group of Try64 to the 2-OMe oxygen atom of the drug. It is worth to note that no mutant of Tyr64 has been reported so far in the studies reporting TMC207-resistant mutants in mycobacteria, which could argue against the hypothesis of a contribution of this residue to the stabilization of the drug-binding through a H-bonding interaction. Nevertheless, in addition to the fact that this residue might be intrinsically essential to the function of the mycobacterial c-subunit, a recent QSAR study reported that the methoxy group in the 2-position of the quinoline ring plays a crucial role in TMC207 activity, its replacement by other substituents being highly deleterious to the inhibiting potency of the drug (Guillemont, Meyer et al. 2011).

Finally, the mutation Leu59→Val, which is identified for the first time in this study, is associated to a moderate increase of resistance to TMC207 in the *in vitro* mutants and in the complemented *M. smegmatis* strains (4-fold increase). The main structural effect of the replacement of Leu by Val in position 59 is to shift the isopropyl group toward the bottom of the TMC207-binding site, with consequences for steric adjustment of the diarylquinoline in the groove delimited by two C-terminal helices in the c-ring.

In conclusion, our data support the hypothesis that TMC207 blocks the mycobacterial ATP synthase by interacting with the c-ring at the level of a cleft centered on the essential residue Glu61. This binding site would be located in the groove delimitated by two C-terminal helices from two adjacent c subunits, its topological features being mostly modelled by residues located on both sides (Leu59, Glu61, Ala63 and Ile66) and at the bottom (Asp28) of the groove, that correspond to those involved in the development of resistance to the drug.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by an ESCMID Research Grant.

REFERENCES

Abrahams, J. P., A. G. Leslie, R. Lutter, and J. E. Walker. 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. Nature **370:**621-8.

Andries, K., P. Verhasselt, J. Guillemont, H. W. Gohlmann, J. M. Neefs, H. Winkler, J. Van Gestel, P. Timmerman, M. Zhu, E. Lee, P. Williams, D. de Chaffoy, E. Huitric, S. Hoffner, E. Cambau, C. Truffot-Pernot, N. Lounis, and V. Jarlier. 2005. A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*. Science **307:**223-7.

Angevine, C. M., K. A. Herold, O. D. Vincent, and R. H. Fillingame. 2007. Aqueous access pathways in ATP synthase subunit a. Reactivity of cysteine substituted into transmembrane helices 1, 3, and 5. J Biol Chem **282:**9001-7.

Boyer, P. D. 1989. A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. FASEB J **3:**2164-78.

Brunger, A. T., P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. Delano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, and G. L. Warren. 1998. Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. Acta Crystallography D **54:**905-921.

Capaldi, R. A., and R. Aggeler. 2002. Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor. Trends Biochem Sci **27:**154-60.

Chang, J. R., C. H. Lin, S. F. Tsai, I. J. Su, F. C. Tseng, Y. T. Chen, T. S. Chiueh, J. R. Sun, T. S. Huang, Y. S. Chen, and H. Y. Dou. 2010. Genotypic analysis of genes associated with transmission and drug resistance in the Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect **17:**1391-6.

Dautant, A., J. Velours, and M. F. Giraud. 2010. Crystal structure of the Mg.ADP-inhibited state of the yeast F1c10-ATP synthase. J Biol Chem **285:**29502-10.

David, H. L. 1970. Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. Appl Microbiol **20:**810-4.

de Jonge, M. R., L. H. Koymans, J. E. Guillemont, A. Koul, and K. Andries. 2007. A computational model of the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* ATPase by a new drug candidate R207910. Proteins **67:**971-80.

Devenish, R. J., M. Prescott, G. M. Boyle, and P. Nagley. 2000. The oligomycin axis of mitochondrial ATP synthase: OSCP and the proton channel. J Bioenerg Biomembr **32:**507-15.

Diacon, A. H., A. Pym, M. Grobusch, R. Patientia, R. Rustomjee, L. Page-Shipp, C. Pistorius, R. Krause, M. Bogoshi, G. Churchyard, A. Venter, J. Allen, J. C. Palomino, T. De Marez, R. P. van Heeswijk, N. Lounis, P. Meyvisch, J. Verbeeck, W. Parys, K. de Beule, K. Andries, and D. F. Mc Neeley. 2009. The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. N Engl J Med **360:**2397-405.

Dimroth, P., C. von Ballmoos, and T. Meier. 2006. Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series. EMBO Rep **7:**276-82.

Emsley, P., and K. Cowtan. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60:**2126-32.

Eswar, N., B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. S. Madhusudhan, D. Eramian, M. Y. Shen, U. Pieper, and A. Sali. 2006. Comparative protein structure modeling using Modeller. Curr Protoc Bioinformatics **Chapter 5:**Unit 5 6.

Gao, L. Y., R. Groger, J. S. Cox, S. M. Beverley, E. H. Lawson, and E. J. Brown. 2003. Transposon mutagenesis of *Mycobacterium marinum* identifies a locus linking pigmentation and intracellular survival. Infect Immun **71:**922-9.

Guillemont, J., C. Meyer, A. Poncelet, X. Bourdrez, and K. Andries. 2011. Diarylquinolines, synthesis pathways and quantitative structure-activity relationship studies leading to the discovery of TMC207. Future Med Chem **3:**1345-60.

Haagsma, A. C., R. Abdillahi-Ibrahim, M. J. Wagner, K. Krab, K. Vergauwen, J. Guillemont, K. Andries, H. Lill, A. Koul, and D. Bald. 2009. Selectivity of TMC207 towards mycobacterial ATP synthase compared with that towards the eukaryotic homologue. Antimicrob Agents Chemother **53:**1290-2.

Haagsma, A. C., I. Podasca, A. Koul, K. Andries, J. Guillemont, H. Lill, and D. Bald. 2011. Probing the interaction of the diarylquinoline TMC207 with its target mycobacterial ATP synthase. PLoS One **6:**e23575.

Huitric, E., P. Verhasselt, K. Andries, and S. E. Hoffner. 2007. In vitro antimycobacterial spectrum of a diarylquinoline ATP synthase inhibitor. Antimicrob Agents Chemother **51:**4202-4.

Huitric, E., P. Verhasselt, A. Koul, K. Andries, S. Hoffner, and D. I. Andersson. 2010. Rates and mechanisms of resistance development in *Mycobacterium tuberculosis* to a novel diarylquinoline ATP synthase inhibitor. Antimicrob Agents Chemother **54:**1022-8.

Jiang, W., J. Hermolin, and R. H. Fillingame. 2001. The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of *Escherichia coli* ATP synthase is 10. Proc Natl Acad Sci U S A **98:**4966-71.

Johnson, R., E. M. Streicher, G. E. Louw, R. M. Warren, P. D. van Helden, and T. C. Victor. 2006. Drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Curr Issues Mol Biol **8:**97-111.

Krah, A., D. Pogoryelov, T. Meier, and J. D. Faraldo-Gomez. 2010. On the structure of the proton-binding site in the F(o) rotor of chloroplast ATP synthases. J Mol Biol **395:**20-7.

Martin-Galiano, A. J., B. Gorgojo, C. M. Kunin, and A. G. de la Campa. 2002. Mefloquine and new related compounds target the F(0) complex of the F(0)F(1) H(+)-ATPase of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **46:**1680-7.

Meier, T., A. Krah, P. J. Bond, D. Pogoryelov, K. Diederichs, and J. D. Faraldo-Gomez. 2009. Complete ion-coordination structure in the rotor ring of Na+-dependent F-ATP synthases. J Mol Biol **391:**498-507.

Meier, T., P. Polzer, K. Diederichs, W. Welte, and P. Dimroth. 2005. Structure of the rotor ring of F-Type Na+-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*. Science **308:**659-62.

Mitome, N., T. Suzuki, S. Hayashi, and M. Yoshida. 2004. Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: indication of noninteger 10:3 H+/ATP ratio and permissive elastic coupling. Proc Natl Acad Sci U S A **101:**12159-64.

Morris, G., D. Goodsell, R. Holliday, R. Huey, W. Hart, R. Belew, and A. Olson. 1998. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical free energy function. J Computational Chemistry **19:**1639-62.

Noji, H., R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinosita, Jr. 1997. Direct observation of the rotation of F1-ATPase. Nature **386:**299-302.

Petrella, S., E. Cambau, A. Chauffour, K. Andries, V. Jarlier, and W. Sougakoff. 2006. Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline R207910 in mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother **50:**2853-6.

Petrella, S., D. Clermont, I. Casin, V. Jarlier, and W. Sougakoff. 2001. Novel class A beta-lactamase Sed-1 from *Citrobacter sedlakii*: genetic diversity of beta-lactamases within the Citrobacter genus. Antimicrob Agents Chemother **45:**2287-98.

Pogoryelov, D., O. Yildiz, J. D. Faraldo-Gomez, and T. Meier. 2009. High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase. Nat Struct Mol Biol **16:**1068-73.

Preiss, L., O. Yildiz, D. B. Hicks, T. A. Krulwich, and T. Meier. 2010. A new type of proton coordination in an F(1)F(o)-ATP synthase rotor ring. PLoS Biol **8:**e1000443.

Steed, P. R., and R. H. Fillingame. 2009. Aqueous accessibility to the transmembrane regions of subunit c of the *Escherichia coli* F1F0 ATP synthase. J Biol Chem **284:**23243-50.

Stock, D., A. G. Leslie, and J. E. Walker. 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. Science **286:**1700-5.

Vik, S. B., and R. R. Ishmukhametov. 2005. Structure and function of subunit a of the ATP synthase of *Escherichia coli*. J Bioenerg Biomembr **37:**445-9.

Vollmar, M., D. Schlieper, M. Winn, C. Buchner, and G. Groth. 2009. Structure of the c14 rotor ring of the proton translocating chloroplast ATP synthase. J Biol Chem **284:**18228-35.

von Ballmoos, C., G. M. Cook, and P. Dimroth. 2008. Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. Annu Rev Biophys **37:**43-64.

von Ballmoos, C., A. Wiedenmann, and P. Dimroth. 2009. Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases. Annu Rev Biochem **78:**649-72.

Watt, I. N., M. G. Montgomery, M. J. Runswick, A. G. Leslie, and J. E. Walker. 2010. Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A **107:**16823-7.

Werngren, J., and S. E. Hoffner. 2003. Drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate. J Clin Microbiol **41:**1520-4.

Yoshida, M., E. Muneyuki, and T. Hisabori. 2001. ATP synthase-a marvellous rotary engine of the cell. Nat Rev Mol Cell Biol **2:**669-77.

TABLE 1. Primers used for DNA amplification, sequencing and site directed mutagenesis of *atp* genes of *Mycobacteria* species.

Name of primer	Sequence (5' to 3')
atpBS	TGTAYTTCAGCCARGCSATGG
atpFAS	CCGTTSGGDABGAGGAAGTTG
atpBBKS	ATGACTGAGACCATCCTGGCC
atpBBKAS	AATCGCGCTCACTTCACCCAT
atpBABS_S	TTCGGGGTTGCGTTGTTCCAGG
atpEABS_AS	AACAATTGTGGGGTCCGCCAT
opeatpBKS1	CGGGTGGTTTCCGCTCCATCA
opeatpBKAS2	TGATGCG CTCCGCCTCGACGTC
opeatpBKS3	AGCGCACCGTGTTGTGGAAG
opeatpBKAS4	TAGATACGGCTCAGCACTTCGG
opeatpBKS5	TGCGGTGGCTCGCCGCGGCGAAA
opeatpBKAS6	TTTGAAACCGGCGGA CTCCGACGC
opeatpBKS7	TCGGGCAGAAGGGAACTACCATCG
opeatpBKAS8	GCTATTTCTTCTTCTTCGGCGCCGG
opeatpBKS9	GCTTCGCGGCCACCGGTGGCGGCT
opeatpBKAS10	ACCTAGCTTGGGCCTAGCGGGCTTC
opeatpBKS11	ACGCTGATGGCAAACCGCGAGCG
opeatpBKAS12	GCCAGCGTGGGCTGGTATCCCAC
opeatpBKS13	CAAGACGTATTGCTGTTC ATCGACAACA
opeatpBKAS14	ACAACGACGAGCACGACCATGCCGAT
atpEsmeLYGE	GGAATTCTTACTGAAGGCCAGGAGTGGC
atpEsmeLYGS	TCCCCCGGGATCTCGATCCCAACGCCATCA
atpEBKLYGE	GGAATTCTTACTTGACGGGTGTAGCGAA
atpEBKLYGS	TCCCCCGGGACCCCACTATCGCTGCCGGCG
pLYG204	GGTTTCATCCCCGATCCGGAG
Primers used to mutate the *M. smegmatis atpE* gene	
atpEsmeI66MS	GCCGCGTACTTCATGAACCTGGCCTTCATGGCG
atpEsmeI66MAS	CGCCATGAAGGCCAGGTTCATGAAGTACGCGGC
atpEsmeD28GS	GCCGGTATCGGCGGCGGTATCGCGGGTAACGCG
atpEsmeD28GAS	CGCGTTACCCGCGATACCGCCGCCGATACCGGC
atpEsmeD28VS	GCCGGTATCGGCGTCGGTATCGCGGGTAACGCG
atpEsmeD28VAS	CGCGTTACCCGCGATACCGACGCCGATACCGGC
atpEsmeD28AS	GCCGGTATCGGCGCCGGTATCGCGGGTAACGCG
atpEsmeD28AAS	CGCGTTACCCGCGATACCGGCGCCGATACCGGC
atpEsmeE61DS	GTCGGTCTGGTGGACGCCGCGTACTTCATC
atpEsmeE61DAS	GATGAAGTACGCGGCGTCCACCAGACCGAC
atpEsmeA63PS	GGTCTGGTGGAAGCCCCGTACTTCATCAACCTGGCC
atpEsmeA63PAS	GGCCAGGTTGATGAAGTACGGGGCTTCCACCAGACC
atpEsmeL59VS	CCGTTCTTCATCACCGTCGGTGTGGTGGAAGCCGCGTA
atpEsmeL59VAS	TACGCGGCTTCCACCACACCGACGGTGATGAAGAACGG
atpEsmeA63MS	GGTCTGGTGGAAGCCATGTACTTCATCAACCTGGCC
atpEsmeA63MAS	GGCCAGGTTGATGAAGTACATGGCTTCCACCAGACC

Primers used to mutate the *M. tuberculosis atpE* gene

atpEBKA63PS	GGTTTGGTTGAGGCGCCATACTTCATCAACCTGGCG
atpEBKA63PAS	CGCCAGGTTGATGAAGTATGGCGCCTCAACCAAACC
atpEBKE61DS	GTCGGTTTGGTTGACGCGGCATACTTCATCAAC
atpEBKE61DAS	GTTGATGAAGTATGCCGCGTCAACCAAACCGAC
atpEBKL59VS	CGTTCTTCATCACCGTCGGTGTGGTTGAGGCGGCATAC
atpEBKL59VAS	GTATGCCGCCTCAACCACACCGACGGTGATGAAGAACG
atpEBKI66MS	GCGGCATACTTCATGAACCTGGCGTTTATGGCG
atpEKI66MAS	CGCCATAAACGCCAGGTTCATGAAGTATGCCGC
atpEBKD28GS	GCCGGTATCGGTGGCGGTGTCGCCGGTAACGCG
atpEBKD28GAS	CGCGTTACCGGCGACACCGCCACCGATACCGGC

TABLE 2. Phenotypic and genotypic characteristics of mutants resistant to TMC207 obtained from two reference strains (*M. tuberculosis* H37Rv and *M. smegmatis* mc2155) and five clinical isolates (*M. tuberculosis* P, D and LQ, *M. fortuitum* B and *M. abscessus* V).

Strains	Mutation frequency	Number of mutants/ nr of colonies tested	Mutations found in subunit c (nr of mutants)	MIC (mg/L)		
				mutant	wild type	rate of MIC increase
M. tuberculosis H37Rv	10^{-8}	4/25	A63P (4)	4	0.03	133
P	5.10^{-8}	5/7	D28G (4)	0.5		16
			E61D (1)	Nd		
D	10^{-8}	5/10	A63P (2)	4		133
			L59V (1)	0.25		8
			E61D (2)	0.5		16
LQ	10^{-8}	5/6	D28G (1)	0.5		16
			E61D (2)	1		33
			A63P (1)	4		133
			I66M (1)	1		33
M. fortuitum B	$1.5.10^{-8}$	9/9	D28A (9)	4	0.010	400
M. abscessus V	$1.5.10^{-8}$	8/17	A63P (1)	16	0.25	64
			D28A (7)	8		32
M. smegmatis $mc^{2}155$	nd	8/8	I66M (8)	16	0.12	133

TABLE 3. MIC of TMC207 for *M. smegmatis* complemented strains.

Host Strain	Gene and source	Mutation	Recombinant Plasmid	MIC (mg/L)
***M. smegmatis* mc^{2}155**	none	none	none	0.12
	none	none	pLYG204	0.12
	atpE of *M. smegmatis*	none	pLYG-*atpE*sme^{wt}	0.12
	atpE of *M. tuberculosis*	none	pLYG-*atpE*BK^{wt}	0.12
***M. smegmatis* mc^{2}155**	*atpE* of *M. smegmatis*	D28V	pLYG-*atpE*sme^{D28V}	16
		D28A	pLYG-*atpE*sme^{D28A}	16
		D28G	pLYG-*atpE*sme^{D28G}	16
		I66M	pLYG-*atpE*sme^{I66M}	8
		E61D	pLYG-*atpE*sme^{E61D}	4
		L59V	pLYG-*atpE*sme^{L59V}	0.5
		A63P	pLYG-*atpE*sme^{A63P}	0.5
		A63M	pLYG-*atpE*sme^{A63M}	0.5
***M. smegmatis* mc^{2}155**	*atpE* of *M. tuberculosis*	D28G	pLYG-*atpE*BK^{D28G}	0.12
		L59V	pLYG-*atpE*BK^{L59V}	0.12
		E61D	pLYG-*atpE*BK^{E61D}	0.12
		A63P	pLYG-*atpE*BK^{A63P}	0.12
		I66M	pLYG-*atpE*BK^{I66M}	0.12

Figure 1. TMC207 geometrie R,S.

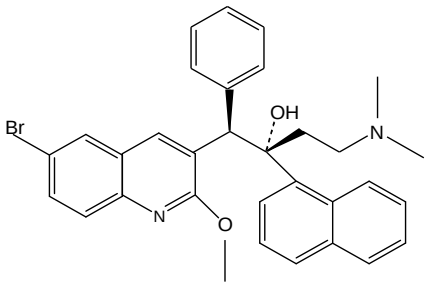


Figure 2. Multiple alignment of the subunits c from *M. abscessus* (M.abs), *M. tuberculosis* (M.tub), *M. fortuitum* (M.for), *M. smegmatis* (M.sme), *E. coli* (E.col), *Spirulina platensis* (S.pla) and *I. tartaricus* (I.tar). Identical residues are marked with an asterisk. The grey shadow highlights variability between the amino acids from the mycobacterial species. The mutated positions found in the drug-resistant mycobacterial strains (positions 28, 59, 61, 63 and 66, *M. tuberculosis* numbering) are boxed. The mutated residues are indicated below the boxes. Amino acids shaded in black in the sequence of *I. tartaricus* and *S. platensis* correspond to the amino acids involved in the H^+/Na^+ binding in the subunit c of these species, respectively. Secondary-structure elements are indicated above the sequences.

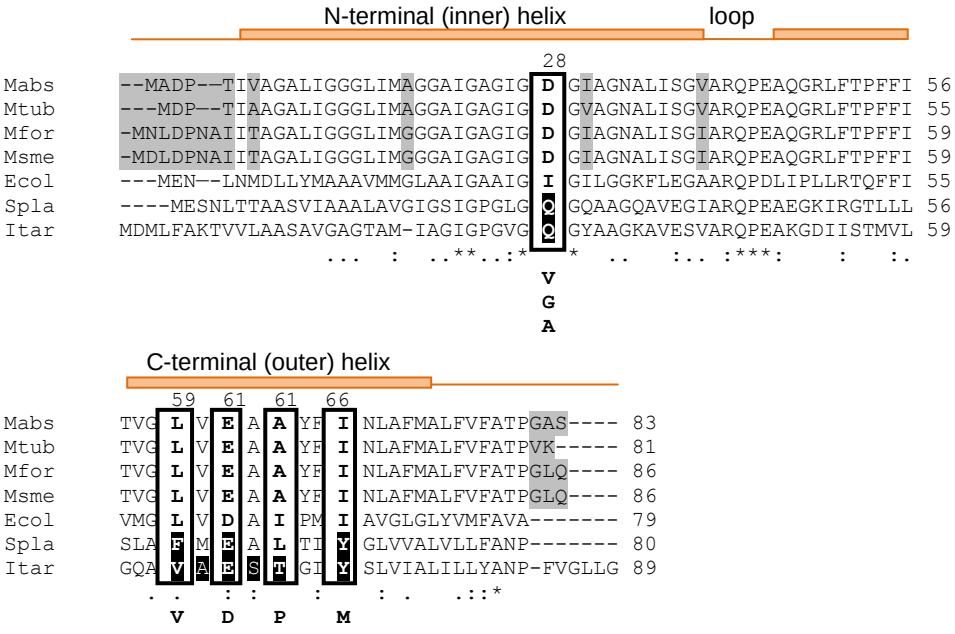


Figure 3. Na^+/H^+ binding sites in the crystallographic structures of (A) *I. tartaricus and* (B) *S. platensis.* The amino acids found in the ion coordination regions are shown in stick representation. Hydrogen bonds are represented by dashed lines. (C) Structure model of the same region in *M. tuberculosis.* The amino acids shown in stick representation (apart from Tyr64) are those implicated in TMC207-resistance.

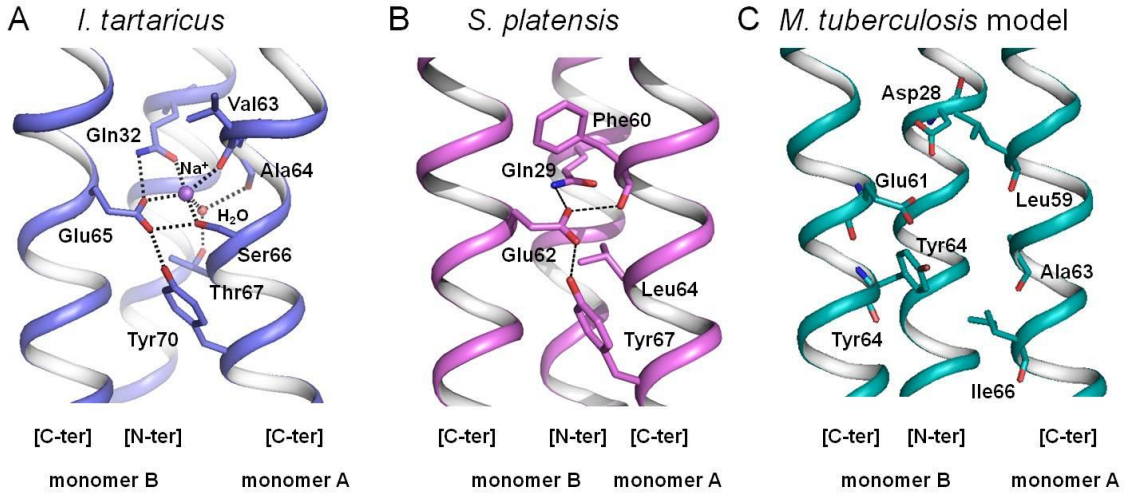


Figure 4. Side view of the surface representation of the structure models for the c-rings of (A) *M. smegmatis* and (B) *M. tuberculosis* (CPK colors).

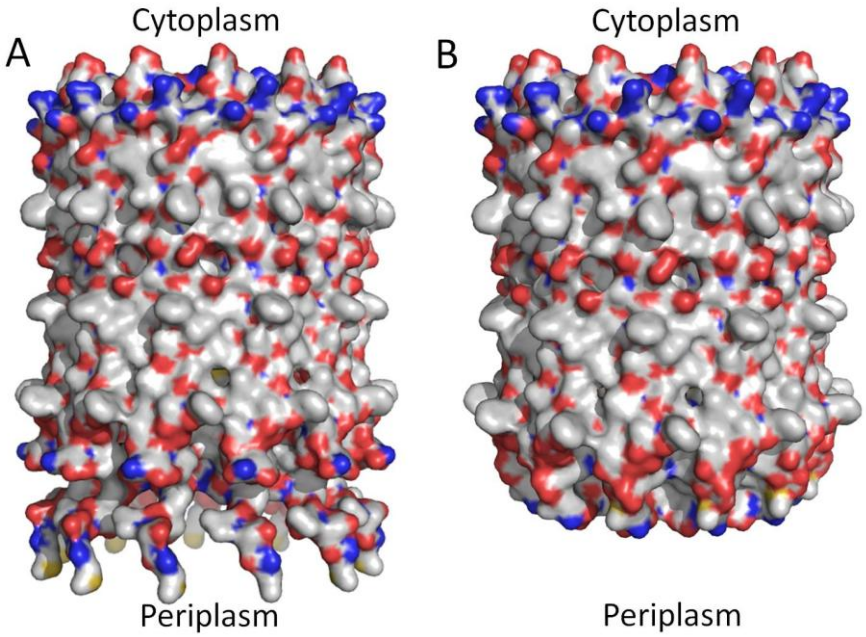
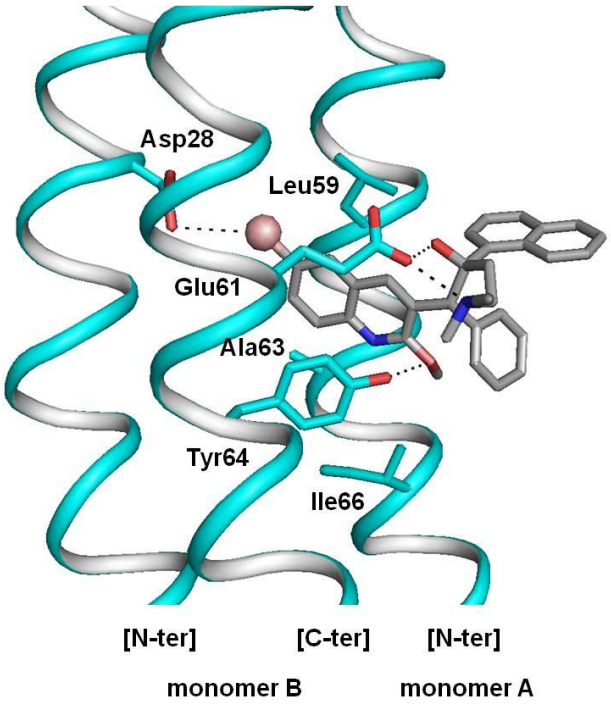


Figure 5. Optimal docking result obtained for the R,S stereoisomer of TMC207 in the c-ring of *M. tuberculosis*. The polypeptide chains forming the binding cleft are shown in ribbon representation. The amino acids residues contributing to the binding region are shown in stick representation. Oxygen and nitrogen atoms are indicated in red and dark blue, respectively. The TMC207 molecule is represented by using CPK colors, the bromine atom being shown as a sphere. Hydrogen and halogen bonds are represented by dotted lines.



BIBLIOGRAPHIE

Abrahams, J. P., A. G. Leslie, et al. (1994). "Structure at 2.8 A resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria." Nature **370**(6491): 621-8.
Alderwick, L. J., H. L. Birch, et al. (2007). "Structure, function and biosynthesis of the Mycobacterium tuberculosis cell wall: arabinogalactan and lipoarabinomannan assembly with a view to discovering new drug targets." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1325-8.
Andersson, G. E. and P. M. Sharp (1996). "Codon usage in the Mycobacterium tuberculosis complex." Microbiology **142 (Pt 4)**: 915-25.
Andries, K., P. Verhasselt, et al. (2005). "A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis." Science **307**(5707): 223-7.
Angevine, C. M., K. A. Herold, et al. (2007). "Aqueous access pathways in ATP synthase subunit a. Reactivity of cysteine substituted into transmembrane helices 1, 3, and 5." J Biol Chem **282**(12): 9001-7.
Ariga, T., E. Muneyuki, et al. (2007). "F1-ATPase rotates by an asymmetric, sequential mechanism using all three catalytic subunits." Nat Struct Mol Biol **14**(9): 841-6.
Arinaminpathy, Y., E. Khurana, et al. (2009). "Computational analysis of membrane proteins: the largest class of drug targets." Drug Discov Today **14**(23-24): 1130-5.
Ashraf, H. (2005). "A new weapon against TB?" Drug Discov Today **10**(4): 230-1.
Bald, D. and A. Koul (2010). "Respiratory ATP synthesis: the new generation of mycobacterial drug targets?" FEMS Microbiol Lett **308**(1): 1-7.
Barry, P. J. and T. M. O'Connor (2007). "Novel agents in the management of Mycobacterium tuberculosis disease." Curr Med Chem **14**(18): 2000-8.
Beis, K., J. Nesper, et al. (2004). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Wza outer-membrane lipoprotein from Escherichia coli serotype O9a:K30." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 3): 558-60.
Bernal, R. A. and D. Stock (2004). "Three-dimensional structure of the intact Thermus thermophilus H+-ATPase/synthase by electron microscopy." Structure **12**(10): 1789-98.
Boshoff, H. I. and V. Mizrahi (1998). "Purification, gene cloning, targeted knockout, overexpression, and biochemical characterization of the major pyrazinamidase from Mycobacterium smegmatis." J Bacteriol **180**(22): 5809-14.
Boyer, P. D. (1989). "A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis." FASEB J **3**(10): 2164-78.
Braibant, M., P. Gilot, et al. (2000). "The ATP binding cassette (ABC) transport systems of Mycobacterium tuberculosis." FEMS Microbiol Rev **24**(4): 449-67.
Brennan, P. J. and H. Nikaido (1995). "The envelope of mycobacteria." Annu Rev Biochem **64**: 29-63.
Brunger, A. T., P. D. Adams, et al. (1998). "Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **54**(Pt 5): 905-21.
Brunger, A. T., P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. Delano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, and G. L. Warren. (1998). "Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination." Acta Crystallography D **54**: 905-921.

Burian, J., S. Ramon-Garcia, et al. (2011). "The mycobacterial transcriptional regulator whiB7 links redox homeostasis and intrinsic antibiotic resistance." J Biol Chem.

Cabezon, E., M. G. Montgomery, et al. (2003). "The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1." Nat Struct Biol **10**(9): 744-50.

Capaldi, R. A. and R. Aggeler (2002). "Mechanism of the F(1)F(0)-type ATP synthase, a biological rotary motor." Trends Biochem Sci **27**(3): 154-60.

Chang, G., R. H. Spencer, et al. (1998). "Structure of the MscL homolog from Mycobacterium tuberculosis: a gated mechanosensitive ion channel." Science **282**(5397): 2220-6.

Chang, J. R., C. H. Lin, et al. "Genotypic analysis of genes associated with transmission and drug resistance in the Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis." Clin Microbiol Infect **17**(9): 1391-6.

Chang, J. R., C. H. Lin, et al. (2010). "Genotypic analysis of genes associated with transmission and drug resistance in the Beijing lineage of Mycobacterium tuberculosis." Clin Microbiol Infect **17**(9): 1391-6.

Cingolani, G. and T. M. Duncan (2011). "Structure of the ATP synthase catalytic complex (F(1)) from Escherichia coli in an autoinhibited conformation." Nat Struct Mol Biol **18**(6): 701-7.

Cohen, J. (2004). "Medicine. New TB drug promises shorter, simpler treatment." Science **306**(5703): 1872.

Cole, S. T. (2002). "Comparative and functional genomics of the Mycobacterium tuberculosis complex." Microbiology **148**(Pt 10): 2919-28.

Cole, S. T. and P. M. Alzari (2005). "Microbiology. TB--a new target, a new drug." Science **307**(5707): 214-5.

Cole, S. T. and P. M. Alzari (2007). "Towards new tuberculosis drugs." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1321-4.

Cole, S. T., R. Brosch, et al. (1998). "Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence." Nature **393**(6685): 537-44.

Cook, G. M., S. Keis, et al. (2003). "Purification and biochemical characterization of the F1Fo-ATP synthase from thermoalkaliphilic Bacillus sp. strain TA2.A1." J Bacteriol **185**(15): 4442-9.

Cross, R. L. and L. Taiz (1990). "Gene duplication as a means for altering H+/ATP ratios during the evolution of FoF1 ATPases and synthases." FEBS Lett **259**(2): 227-9.

Daffe, M. and G. Etienne (1999). "The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity." Tuber Lung Dis **79**(3): 153-69.

Dautant, A., J. Velours, et al. (2010). "Crystal structure of the Mg.ADP-inhibited state of the yeast F1c10-ATP synthase." J Biol Chem **285**(38): 29502-10.

David, H. L. (1970). "Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of Mycobacterium tuberculosis." Appl Microbiol **20**(5): 810-4.

de Jonge, M. R., L. H. Koymans, et al. (2007). "A computational model of the inhibition of Mycobacterium tuberculosis ATPase by a new drug candidate R207910." Proteins **67**(4): 971-80.

Devenish, R. J., M. Prescott, et al. (2000). "The oligomycin axis of mitochondrial ATP synthase: OSCP and the proton channel." J Bioenerg Biomembr **32**(5): 507-15.

Dhiman, R. K., S. Mahapatra, et al. (2009). "Menaquinone synthesis is critical for maintaining mycobacterial viability during exponential growth and recovery from non-replicating persistence." Mol Microbiol **72**(1): 85-97.
Diacon, A. H., A. Pym, et al. (2009). "The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis." N Engl J Med **360**(23): 2397-405.
Dimroth, P., C. von Ballmoos, et al. (2006). "Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series." EMBO Rep **7**(3): 276-82.
Dunn, S. D., M. Revington, et al. (2000). "The b subunit of Escherichia coli ATP synthase." J Bioenerg Biomembr **32**(4): 347-55.
Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-32.
Espinal, M. A., S. J. Kim, et al. (2000). "Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries." JAMA **283**(19): 2537-45.
Eswar, N., B. Webb, et al. (2006). "Comparative protein structure modeling using Modeller." Curr Protoc Bioinformatics **Chapter 5**: Unit 5 6.
Faller, M., M. Niederweis, et al. (2004). "The structure of a mycobacterial outer-membrane channel." Science **303**(5661): 1189-92.
Ferguson, S. A., S. Keis, et al. (2006). "Biochemical and molecular characterization of a Na+-translocating F1Fo-ATPase from the thermoalkaliphilic bacterium Clostridium paradoxum." J Bacteriol **188**(14): 5045-54.
Fu, L. M. and C. S. Fu-Liu (2002). "Is Mycobacterium tuberculosis a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens?" Tuberculosis (Edinb) **82**(2-3): 85-90.
Furuike, S., M. Nakano, et al. (2011). "Resolving stepping rotation in Thermus thermophilus H(+)-ATPase/synthase with an essentially drag-free probe." Nat Commun **2**: 233.
Galamba, A., K. Soetaert, et al. (2001). "Disruption of adhC reveals a large duplication in the Mycobacterium smegmatis mc(2)155 genome." Microbiology **147**(Pt 12): 3281-94.
Galanis, M., J. R. Mattoon, et al. (1989). "Amino acid substitutions in mitochondrial ATP synthase subunit 9 of Saccharomyces cerevisiae leading to venturicidin or ossamycin resistance." FEBS Lett **249**(2): 333-6.
Gao, L. Y., R. Groger, et al. (2003). "Transposon mutagenesis of Mycobacterium marinum identifies a locus linking pigmentation and intracellular survival." Infect Immun **71**(2): 922-9.
Gengenbacher, M., S. P. Rao, et al. (2010). "Nutrient-starved, non-replicating Mycobacterium tuberculosis requires respiration, ATP synthase and isocitrate lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability." Microbiology **156**(Pt 1): 81-7.
Gibbons, C., M. G. Montgomery, et al. (2000). "The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 A resolution." Nat Struct Biol **7**(11): 1055-61.
Gillespie, S. H. (2002). "Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective." Antimicrob Agents Chemother **46**(2): 267-74.
Ginalski, K., A. Elofsson, et al. (2003). "3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions." Bioinformatics **19**(8): 1015-8.

Girvin, M. E., V. K. Rastogi, et al. (1998). "Solution structure of the transmembrane H+-transporting subunit c of the F1F0 ATP synthase." Biochemistry **37**(25): 8817-24.
Gledhill, J. R., M. G. Montgomery, et al. (2007). "Mechanism of inhibition of bovine F1-ATPase by resveratrol and related polyphenols." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(34): 13632-7.
Gonzalo-Asensio, J., S. Mostowy, et al. (2008). "PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of Mycobacterium tuberculosis virulence." PLoS One **3**(10): e3496.
Groth, G. and E. Pohl (2001). "The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 A resolution." J Biol Chem **276**(2): 1345-52.
Guillemin, I., V. Jarlier, et al. (1998). "Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in mycobacteria." Antimicrob Agents Chemother **42**(8): 2084-8.
Guillemont, J., C. Meyer, et al. (2011). "Diarylquinolines, synthesis pathways and quantitative structure--activity relationship studies leading to the discovery of TMC207." Future Med Chem **3**(11): 1345-60.
Gutierrez, M. C., S. Brisse, et al. (2005). "Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis." PLoS Pathog **1**(1): e5.
Haagsma, A. C., R. Abdillahi-Ibrahim, et al. (2009). "Selectivity of TMC207 towards mycobacterial ATP synthase compared with that towards the eukaryotic homologue." Antimicrob Agents Chemother **53**(3): 1290-2.
Haagsma, A. C., N. N. Driessen, et al. (2010). "ATP synthase in slow- and fast-growing mycobacteria is active in ATP synthesis and blocked in ATP hydrolysis direction." FEMS Microbiol Lett **313**(1): 68-74.
Haagsma, A. C., I. Podasca, et al. (2011). "Probing the interaction of the diarylquinoline TMC207 with its target mycobacterial ATP synthase." PLoS One **6**(8): e23575.
Hale, Y. M., G. E. Pfyffer, et al. (2001). "Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned." Clin Infect Dis **33**(6): 834-46.
Hase, C. C., N. D. Fedorova, et al. (2001). "Sodium ion cycle in bacterial pathogens: evidence from cross-genome comparisons." Microbiol Mol Biol Rev **65**(3): 353-70, table of contents.
Hausrath, A. C., R. A. Capaldi, et al. (2001). "The conformation of the epsilon- and gamma-subunits within the Escherichia coli F(1) ATPase." J Biol Chem **276**(50): 47227-32.
Hazard, A. and C. Montemagno (2002). "Improved purification for thermophilic F1F0 ATP synthase using n-dodecyl beta-D-maltoside." Arch Biochem Biophys **407**(1): 117-24.
Heinz, C. and M. Niederweis (2000). "Selective extraction and purification of a mycobacterial outer membrane protein." Anal Biochem **285**(1): 113-20.
Hicks, D. B., J. Liu, et al. (2010). "F1F0-ATP synthases of alkaliphilic bacteria: lessons from their adaptations." Biochim Biophys Acta **1797**(8): 1362-77.
Higashi, T., V. K. Kalra, et al. (1975). "Energy-transducing membrane-bound coupling factor-ATPase from Mycobacterium phlei. I. Purification, homogeneity, and properties." J Biol Chem **250**(16): 6541-8.
Hinds, J., E. Mahenthiralingam, et al. (1999). "Enhanced gene replacement in mycobacteria." Microbiology **145 (Pt 3)**: 519-27.

Huitric, E., P. Verhasselt, et al. (2007). "In vitro antimycobacterial spectrum of a diarylquinoline ATP synthase inhibitor." Antimicrob Agents Chemother **51**(11): 4202-4.
Huitric, E., P. Verhasselt, et al. (2010). "Rates and mechanisms of resistance development in Mycobacterium tuberculosis to a novel diarylquinoline ATP synthase inhibitor." Antimicrob Agents Chemother **54**(3): 1022-8.
Hurdle, J. G., A. J. O'Neill, et al. (2011). "Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections." Nat Rev Microbiol **9**(1): 62-75.
Ibrahim, M., K. Andries, et al. (2007). "Synergistic activity of R207910 combined with pyrazinamide against murine tuberculosis." Antimicrob Agents Chemother **51**(3): 1011-5.
Ibrahim, M., C. Truffot-Pernot, et al. (2009). "Sterilizing activity of R207910 (TMC207)-containing regimens in the murine model of tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **180**(6): 553-7.
Inesi, G. (2011). "Calcium and copper transport ATPases: analogies and diversities in transduction and signaling mechanisms." J Cell Commun Signal **5**(3): 227-37.
Ishmukhametov, R., T. Hornung, et al. (2010). "Direct observation of stepped proteolipid ring rotation in E. coli FF-ATP synthase." EMBO J **29**(23): 3911-23.
Jain, A. and P. Dixit (2008). "Multidrug-resistant to extensively drug resistant tuberculosis: what is next?" J Biosci **33**(4): 605-16.
Jain, S. K., G. Lamichhane, et al. (2008). "Antibiotic treatment of tuberculosis: old problems, new solutions." Microbe **3**(6): 285-292.
Jarlier, V., L. Gutmann, et al. (1991). "Interplay of cell wall barrier and beta-lactamase activity determines high resistance to beta-lactam antibiotics in Mycobacterium chelonae." Antimicrob Agents Chemother **35**(9): 1937-9.
Jarlier, V. and H. Nikaido (1994). "Mycobacterial cell wall: structure and role in natural resistance to antibiotics." FEMS Microbiol Lett **123**(1-2): 11-8.
Jaroslawski, S., B. Zadek, et al. (2007). "Direct visualization of KirBac3.1 potassium channel gating by atomic force microscopy." J Mol Biol **374**(2): 500-5.
Ji, B., A. Chauffour, et al. (2006). "Bactericidal activities of R207910 and other newer antimicrobial agents against Mycobacterium leprae in mice." Antimicrob Agents Chemother **50**(4): 1558-60.
Ji, B., S. Lefrancois, et al. (2006). "In vitro and in vivo activities of rifampin, streptomycin, amikacin, moxifloxacin, R207910, linezolid, and PA-824 against Mycobacterium ulcerans." Antimicrob Agents Chemother **50**(6): 1921-6.
Jiang, W., J. Hermolin, et al. (2001). "The preferred stoichiometry of c subunits in the rotary motor sector of Escherichia coli ATP synthase is 10." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 4966-71.
John, U. P. and P. Nagley (1986). "Amino acid substitutions in mitochondrial ATPase subunit 6 of Saccharomyces cerevisiae leading to oligomycin resistance." FEBS Lett **207**(1): 79-83.
Johnson, R., E. M. Streicher, et al. (2006). "Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis." Curr Issues Mol Biol **8**(2): 97-111.
Junge, W., H. Sielaff, et al. (2009). "Torque generation and elastic power transmission in the rotary F(O)F(1)-ATPase." Nature **459**(7245): 364-70.

Kagawa, R., M. G. Montgomery, et al. (2004). "The structure of bovine F1-ATPase inhibited by ADP and beryllium fluoride." EMBO J **23**(14): 2734-44.
Kang, S. U., K. Fuchs, et al. (2009). "Gel-based mass spectrometric analysis of a strongly hydrophobic GABAA-receptor subunit containing four transmembrane domains." Nat Protoc **4**(7): 1093-102.
Kapust, R. B. and D. S. Waugh (1999). "Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused." Protein Sci **8**(8): 1668-74.
Kayalar, C., J. Rosing, et al. (1977). "An alternating site sequence for oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and exchange reaction inhibitions." J Biol Chem **252**(8): 2486-91.
Korepanova, A., J. D. Moore, et al. (2007). "Expression of membrane proteins from Mycobacterium tuberculosis in Escherichia coli as fusions with maltose binding protein." Protein Expr Purif **53**(1): 24-30.
Koul, A., N. Dendouga, et al. (2007). "Diarylquinolines target subunit c of mycobacterial ATP synthase." Nat Chem Biol **3**(6): 323-4.
Koul, A., L. Vranckx, et al. (2008). "Diarylquinolines are bactericidal for dormant mycobacteria as a result of disturbed ATP homeostasis." J Biol Chem **283**(37): 25273-80.
Krah, A., D. Pogoryelov, et al. "On the structure of the proton-binding site in the F(o) rotor of chloroplast ATP synthases." J Mol Biol **395**(1): 20-7.
Krah, A., D. Pogoryelov, et al. (2010). "On the structure of the proton-binding site in the F(o) rotor of chloroplast ATP synthases." J Mol Biol **395**(1): 20-7.
Laskowski, R. A., D. S. Moss, et al. (1993). "Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures." J Mol Biol **231**(4): 1049-67.
Lee, B. Y., S. A. Hefta, et al. (1992). "Characterization of the major membrane protein of virulent Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun **60**(5): 2066-74.
Lenaerts, A. J., D. Hoff, et al. (2007). "Location of persisting mycobacteria in a Guinea pig model of tuberculosis revealed by r207910." Antimicrob Agents Chemother **51**(9): 3338-45.
Leone, V., A. Krah, et al. (2010). "On the question of hydronium binding to ATP-synthase membrane rotors." Biophys J **99**(7): L53-5.
Lian, J., Y. Ma, et al. (2009). "High-level expression of soluble subunit b of F1F0 ATP synthase in Escherichia coli cell-free system." Appl Microbiol Biotechnol **85**(2): 303-11.
Loiez-Durocher, C., A. Vachee, et al. (2000). "[Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: diagnostic methods]." Ann Biol Clin (Paris) **58**(3): 291-7.
Lounis, N., T. Gevers, et al. (2008). "Impact of the interaction of R207910 with rifampin on the treatment of tuberculosis studied in the mouse model." Antimicrob Agents Chemother **52**(10): 3568-72.
Lounis, N., T. Gevers, et al. (2009). "ATP synthase inhibition of Mycobacterium avium is not bactericidal." Antimicrob Agents Chemother **53**(11): 4927-9.
Lounis, N., N. Veziris, et al. (2006). "Combinations of R207910 with drugs used to treat multidrug-resistant tuberculosis have the potential to shorten treatment duration." Antimicrob Agents Chemother **50**(11): 3543-7.
Madden, T. D. and P. R. Cullis (1984). "Detergent-induced solubilization of cytochrome c oxidase as detected in a novel reconstituted system." J Biol Chem **259**(12): 7655-8.

Malen, H., F. S. Berven, et al. (2008). "Membrane and membrane-associated proteins in Triton X-114 extracts of Mycobacterium bovis BCG identified using a combination of gel-based and gel-free fractionation strategies." Proteomics **8**(9): 1859-70.
Marabini, R., I. M. Masegosa, et al. (1996). "Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy." J Struct Biol **116**(1): 237-40.
Marigot-Outtandy, D. and C. Perronne (2009). "Les nouveaux antituberculeux." Réanimation **18**.
Martin-Galiano, A. J., B. Gorgojo, et al. (2002). "Mefloquine and new related compounds target the F(0) complex of the F(0)F(1) H(+)-ATPase of Streptococcus pneumoniae." Antimicrob Agents Chemother **46**(6): 1680-7.
Matthies, D., S. Haberstock, et al. (2011). "Cell-Free Expression and Assembly of ATP Synthase." J Mol Biol.
Meier, T., S. A. Ferguson, et al. (2006). "Structural investigations of the membrane-embedded rotor ring of the F-ATPase from Clostridium paradoxum." J Bacteriol **188**(22): 7759-64.
Meier, T., A. Krah, et al. (2009). "Complete ion-coordination structure in the rotor ring of Na+-dependent F-ATP synthases." J Mol Biol **391**(2): 498-507.
Meier, T., U. Matthey, et al. (2003). "Evidence for structural integrity in the undecameric c-rings isolated from sodium ATP synthases." J Mol Biol **325**(2): 389-97.
Meier, T., N. Morgner, et al. (2007). "A tridecameric c ring of the adenosine triphosphate (ATP) synthase from the thermoalkaliphilic Bacillus sp. strain TA2.A1 facilitates ATP synthesis at low electrochemical proton potential." Mol Microbiol **65**(5): 1181-92.
Meier, T., P. Polzer, et al. (2005). "Structure of the rotor ring of F-Type Na+-ATPase from Ilyobacter tartaricus." Science **308**(5722): 659-62.
Menard, R., P. J. Sansonetti, et al. (1993). "Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of Shigella flexneri entry into epithelial cells." J Bacteriol **175**(18): 5899-906.
Menz, R. I., A. G. Leslie, et al. (2001). "The structure and nucleotide occupancy of bovine mitochondrial F(1)-ATPase are not influenced by crystallisation at high concentrations of nucleotide." FEBS Lett **494**(1-2): 11-4.
Miroux, B. and J. E. Walker (1996). "Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." J Mol Biol **260**(3): 289-98.
Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-8.
Mitome, N., T. Suzuki, et al. (2004). "Thermophilic ATP synthase has a decamer c-ring: indication of noninteger 10:3 H+/ATP ratio and permissive elastic coupling." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(33): 12159-64.
Morris, G., D. Goodsell, et al. (1998). "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical free energy function." J Computational Chemistry **19**: 1639-62.
Morris, G. M., D. S. Goodsell, et al. (1998). "Automated docking using a Lamarckian genetic algorith and an empirical free energy function " J. Comput. Chem. **19**(14): 1639-1662.
Muench, S. P., J. Trinick, et al. (2011). "Structural divergence of the rotary ATPases." Q Rev Biophys **44**(3): 311-56.

Mukhopadhyay, S., D. Basu, et al. (1997). "Characterization of a porin from Mycobacterium smegmatis." J Bacteriol **179**(19): 6205-7.
Mulkidjanian, A. Y., P. Dibrov, et al. (2008). "The past and present of sodium energetics: may the sodium-motive force be with you." Biochim Biophys Acta **1777**(7-8): 985-92.
Murphy, K. C., K. G. Campellone, et al. (2000). "PCR-mediated gene replacement in Escherichia coli." Gene **246**(1-2): 321-30.
Nakamoto, R. K., J. A. Baylis Scanlon, et al. (2008). "The rotary mechanism of the ATP synthase." Arch Biochem Biophys **476**(1): 43-50.
Nakanishi-Matsui, M., M. Sekiya, et al. (2010). "The mechanism of rotating proton pumping ATPases." Biochim Biophys Acta **1797**(8): 1343-52.
Neumann, S., U. Matthey, et al. (1998). "Purification and properties of the F1F0 ATPase of Ilyobacter tartaricus, a sodium ion pump." J Bacteriol **180**(13): 3312-6.
Niederweis, M. (2003). "Mycobacterial porins--new channel proteins in unique outer membranes." Mol Microbiol **49**(5): 1167-77.
Noji, H., R. Yasuda, et al. (1997). "Direct observation of the rotation of F1-ATPase." Nature **386**(6622): 299-302.
Novakova, Z., A. I. Majernik, et al. (2009). "Isolation and characterization of a N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-resistant mutant of Methanothermobacter thermautotrophicus with alterations to the ATP synthesis machinery." Folia Microbiol (Praha) **54**(6): 483-6.
Page, R. C., S. Lee, et al. (2009). "Backbone structure of a small helical integral membrane protein: A unique structural characterization." Protein Sci **18**(1): 134-46.
Parish, T. and N. G. Stoker (2000). "Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC mutant by gene replacement." Microbiology **146 (Pt 8)**: 1969-75.
Petrella, S., E. Cambau, et al. (2006). "Genetic basis for natural and acquired resistance to the diarylquinoline R207910 in mycobacteria." Antimicrob Agents Chemother **50**(8): 2853-6.
Petrella, S., D. Clermont, et al. (2001). "Novel class A beta-lactamase Sed-1 from Citrobacter sedlakii: genetic diversity of beta-lactamases within the Citrobacter genus." Antimicrob Agents Chemother **45**(8): 2287-98.
Pogoryelov, D., A. Krah, et al. (2010). "Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the F(o) complex of ATP synthases." Nat Chem Biol **6**(12): 891-9.
Pogoryelov, D., O. Yildiz, et al. (2009). "High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase." Nat Struct Mol Biol **16**(10): 1068-73.
Pogoryelov, D., J. Yu, et al. (2005). "The c15 ring of the Spirulina platensis F-ATP synthase: F1/F0 symmetry mismatch is not obligatory." EMBO Rep **6**(11): 1040-4.
Preiss, L., O. Yildiz, et al. "A new type of proton coordination in an F(1)F(o)-ATP synthase rotor ring." PLoS Biol **8**(8): e1000443.
Preiss, L., O. Yildiz, et al. (2010). "A new type of proton coordination in an F(1)F(o)-ATP synthase rotor ring." PLoS Biol **8**(8): e1000443.
Primm, T. P., C. A. Lucero, et al. (2004). "Health impacts of environmental mycobacteria." Clin Microbiol Rev **17**(1): 98-106.
Protopopova, M., E. Bogatcheva, et al. (2007). "In search of new cures for tuberculosis." Med Chem **3**(3): 301-16.

Qin, H., J. Hu, et al. (2008). "Construction of a series of vectors for high throughput cloning and expression screening of membrane proteins from Mycobacterium tuberculosis." BMC Biotechnol **8**: 51.
Rao, S. P., S. Alonso, et al. (2008). "The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating Mycobacterium tuberculosis." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(33): 11945-50.
Rastogi, V. K. and M. E. Girvin (1999). "Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase." Nature **402**(6759): 263-8.
Reyrat, J. M., F. X. Berthet, et al. (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**(19): 8768-72.
Rodgers, A. J. and M. C. Wilce (2000). "Structure of the gamma-epsilon complex of ATP synthase." Nat Struct Biol **7**(11): 1051-4.
Rohde, K., R. M. Yates, et al. (2007). "Mycobacterium tuberculosis and the environment within the phagosome." Immunol Rev **219**: 37-54.
Rubinstein, J. L., V. K. Dickson, et al. (2005). "ATP synthase from Saccharomyces cerevisiae: location of subunit h in the peripheral stalk region." J Mol Biol **345**(3): 513-20.
Russell, D. G., P. J. Cardona, et al. (2009). "Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma." Nat Immunol **10**(9): 943-8.
Rustomjee, R., A. H. Diacon, et al. (2008). "Early bactericidal activity and pharmacokinetics of the diarylquinoline TMC207 in treatment of pulmonary tuberculosis." Antimicrob Agents Chemother **52**(8): 2831-5.
Sala, C., A. Haouz, et al. (2009). "Genome-wide regulon and crystal structure of BlaI (Rv1846c) from Mycobacterium tuberculosis." Mol Microbiol **71**(5): 1102-16.
Sali, A. and T. L. Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." J Mol Biol **234**(3): 779-815.
Sambongi, Y., Y. Iko, et al. (1999). "Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F0F1): direct observation." Science **286**(5445): 1722-4.
Sani, M., E. N. Houben, et al. (2010). "Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins." PLoS Pathog **6**(3): e1000794.
Saunders, B. M. and W. J. Britton (2007). "Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis." Immunol Cell Biol **85**(2): 103-11.
Sauter, C. and R. Giegé (2001). "La cristallogenèse des macromolécules biologiques." Regard sur la Biochimie **3**.
Scanlon, J. A., M. K. Al-Shawi, et al. (2008). "A rotor-stator cross-link in the F1-ATPase blocks the rate-limiting step of rotational catalysis." J Biol Chem **283**(38): 26228-40.
Schagger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." Anal Biochem **199**(2): 223-31.
Scheres, S. H., R. Nunez-Ramirez, et al. (2008). "Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP." Nat Protoc **3**(6): 977-90.
Shinnick, T. M. and R. C. Good (1994). "Mycobacterial taxonomy." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **13**(11): 884-901.

Shirakihara, Y., A. G. Leslie, et al. (1997). "The crystal structure of the nucleotide-free alpha 3 beta 3 subcomplex of F1-ATPase from the thermophilic Bacillus PS3 is a symmetric trimer." Structure **5**(6): 825-36.

Sielaff, H., H. Rennekamp, et al. (2008). "Domain compliance and elastic power transmission in rotary F(O)F(1)-ATPase." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(46): 17760-5.

Smyth, D. R., M. K. Mrozkiewicz, et al. (2003). "Crystal structures of fusion proteins with large-affinity tags." Protein Sci **12**(7): 1313-22.

Sorzano, C. O., R. Marabini, et al. (2004). "XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy." J Struct Biol **148**(2): 194-204.

Spigelman, M. K. (2007). "New tuberculosis therapeutics: a growing pipeline." J Infect Dis **196 Suppl 1**: S28-34.

Steed, P. R. and R. H. Fillingame (2008). "Subunit a facilitates aqueous access to a membrane-embedded region of subunit c in Escherichia coli F1F0 ATP synthase." J Biol Chem **283**(18): 12365-72.

Steed, P. R. and R. H. Fillingame (2009). "Aqueous accessibility to the transmembrane regions of subunit c of the Escherichia coli F1F0 ATP synthase." J Biol Chem **284**(35): 23243-50.

Stephan, J., V. Stemmer, et al. (2004). "Consecutive gene deletions in Mycobacterium smegmatis using the yeast FLP recombinase." Gene **343**(1): 181-90.

Stock, D., A. G. Leslie, et al. (1999). "Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase." Science **286**(5445): 1700-5.

Stocker, A., S. Keis, et al. (2007). "The structural basis for unidirectional rotation of thermoalkaliphilic F1-ATPase." Structure **15**(8): 904-14.

Taroncher-Oldenburg, G. and G. Stephanopoulos (2000). "Targeted, PCR-based gene disruption in cyanobacteria: inactivation of the polyhydroxyalkanoic acid synthase genes in Synechocystis sp. PCC6803." Appl Microbiol Biotechnol **54**(5): 677-80.

Tomashek, J. J., J. A. Poposki, et al. (2001). "A functional His-tagged c subunit of the Escherichia coli F-type ATPase/Synthase." Arch Biochem Biophys **387**(2): 180-7.

Tortoli, E. (2006). "The new mycobacteria: an update." FEMS Immunol Med Microbiol **48**(2): 159-78.

Tortoli, E., L. Rindi, et al. (2003). "Mycobacterium elephantis: not an exceptional finding in clinical specimens." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **22**(7): 427-30.

Tran, S. L. and G. M. Cook (2005). "The F1Fo-ATP synthase of Mycobacterium smegmatis is essential for growth." J Bacteriol **187**(14): 5023-8.

Unger, V. M., P. A. Hargrave, et al. (1997). "Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices." Nature **389**(6647): 203-6.

Upadhayaya, R. S., J. K. Vandavasi, et al. (2009). "Design, synthesis, biological evaluation and molecular modelling studies of novel quinoline derivatives against Mycobacterium tuberculosis." Bioorg Med Chem **17**(7): 2830-41.

Vik, S. B. and R. R. Ishmukhametov (2005). "Structure and function of subunit a of the ATP synthase of Escherichia coli." J Bioenerg Biomembr **37**(6): 445-9.

Vollmar, M., D. Schlieper, et al. (2009). "Structure of the c14 rotor ring of the proton translocating chloroplast ATP synthase." J Biol Chem **284**(27): 18228-35.

von Ballmoos, C., G. M. Cook, et al. (2008). "Unique rotary ATP synthase and its biological diversity." Annu Rev Biophys **37**: 43-64.
von Ballmoos, C., A. Wiedenmann, et al. (2009). "Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases." Annu Rev Biochem **78**: 649-72.
Vonck, J., K. Y. Pisa, et al. (2009). "Three-dimensional structure of A1A0 ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus by electron microscopy." J Biol Chem **284**(15): 10110-9.
Vonck, J., T. K. von Nidda, et al. (2002). "Molecular architecture of the undecameric rotor of a bacterial Na+-ATP synthase." J Mol Biol **321**(2): 307-16.
Wach, A. (1996). "PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in S. cerevisiae." Yeast **12**(3): 259-65.
Wachter, A., Y. Bi, et al. "Two rotary motors in F-ATP synthase are elastically coupled by a flexible rotor and a stiff stator stalk." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(10): 3924-9.
Wang, S. C., A. Politis, et al. (2010). "Ion mobility mass spectrometry of two tetrameric membrane protein complexes reveals compact structures and differences in stability and packing." J Am Chem Soc **132**(44): 15468-70.
Watt, I. N., M. G. Montgomery, et al. (2010). "Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(39): 16823-7.
Werngren, J. and S. E. Hoffner (2003). "Drug-susceptible Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate." J Clin Microbiol **41**(4): 1520-4.
WHO (Guidelines 2009). "World Health Organisation, Treatment of tuberculosis. Guidelines 4th edition."
WHO (Progress Report 2011). "World Health Organization, Towards universal access to diagnosis and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis by 2015."
WHO (Progress Report 2011). "World Health Organization, Tuberculosis MDR-TB and XDR-TB.".
WHO (Report 2010). World Health Organization, Global Tuberculosis Control 2010.
Wilkens, S., S. D. Dunn, et al. (1997). "Solution structure of the N-terminal domain of the delta subunit of the E. coli ATPsynthase." Nat Struct Biol **4**(3): 198-201.
www.who.org World Health Organization Web Site.
Yagi, H., N. Kajiwara, et al. (2007). "Structures of the thermophilic F1-ATPase epsilon subunit suggesting ATP-regulated arm motion of its C-terminal domain in F1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11233-8.
Yang, Y., D. Auguin, et al. (2011). "Structure of the Mycobacterium tuberculosis OmpATb protein: a model of an oligomeric channel in the mycobacterial cell wall." Proteins **79**(2): 645-61.
Yasuda, R., H. Noji, et al. (2001). "Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase." Nature **410**(6831): 898-904.
Yokoyama, K., K. Nagata, et al. (2003). "Subunit arrangement in V-ATPase from Thermus thermophilus." J Biol Chem **278**(43): 42686-91.
Yoshida, M., E. Muneyuki, et al. (2001). "ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(9): 669-77.

Zhang, Y., M. M. Wade, et al. (2003). "Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid." J Antimicrob Chemother **52**(5): 790-5.

Zhang, Y. and W. W. Yew (2009). "Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis." Int J Tuberc Lung Dis **13**(11): 1320-30.

Ziskind, B. and B. Halioua (2007). "[Tuberculosis in ancient Egypt]." Rev Mal Respir **24**(10): 1277-83.

Zuber, B., M. Chami, et al. (2008). "Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state." J Bacteriol **190**(16): 5672-80.