

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Construction et surexpression de mutants de l'UGM (UDP-Gal mutase), enzyme essentielle de *Mycobacterium tuberculosis*

Bajo, Raquel

Award date:
2006

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**CONSTRUCTION ET SUREXPRESSION DE MUTANTS DE L'UGM (UDP-Gal mutase),
ENZYME ESSENTIELLE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* .**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Raquel BAJO
Juin 2006

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

CONSTRUCTION ET SUREXPRESSION DE MUTANTS DE L'UGM (UDP-Gal mutase), ENZYME ESSENTIELLE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* .

BAJO Raquel

Résumé

Mycobacterium tuberculosis est une bactérie pathogène intracellulaire exactement limitée à l'homme et qui a une paroi très caractéristique. Grâce à elle, *Mycobacterium* peut mener à bien son cycle infectieux. Des études ont été effectuées pour connaître la composition de ces parois disent que cette paroi contient un sucre atypique, l'UDP-Galactofuranose. C'est un sucre qui attache les acides mycoliques typiques du genre *Mycobacterium* qui vont le donner le nom. Ces lipides vont le servir d'enveloppe et ils le protègent de l'atmosphère. Comme des études ont démontré, ce sucre, l'UDP-Galactofuranose est essentiel à la survie de la bactérie et nous nous sommes intéressés à l'enzyme qui forme ces sucres. L'UDP-Galactopyranose mutase est responsable de la formation de ce sucre. Cette enzyme est aussi essentielle à la survie de *Mycobacterium tuberculosis*. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés au mécanisme d'action de cette enzyme. Pour étudier ce mécanisme, nous avons effectué des mutants ponctuels de cette enzyme, en ciblant des acides aminés conservés et susceptibles d'avoir quelque fonction dans le mécanisme d'action de l'enzyme. La stratégie choisie pour obtenir ces mutants est la mutagenèse dirigée. Nous essayerons de purifier ces enzymes mutées pour vérifier s'il existe des variations avec la souche *wild type*. Si nous pouvons trouver des différences, nous pourrions penser au développement d'un antibiotique différent de ceux auxquels *Mycobacterium* est déjà résistant.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2005

Promoteur: X. De Bolle; **Co-promoteur :** S. Vincent

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je voudrais remercier mes promoteurs Mr Xavier De Bolle et Mr Stéphane Vincent pour leur confiance en mes capacités et pour m'avoir ouvert un monde de possibilités.

Je voudrais remercier également le travail et le dévouement de Jenny Pouyez et de Nicolas Trincherio(mon Nico...). Leurs aides pendant mes manipulations au laboratoire ainsi que leurs corrections m'ont été d'une grande utilité. C'est grâce à eux si ce mémoire a été possible. Merci infiniment, Jenny et Nicolas pour vos efforts et votre patience. Merci de m'avoir appris tant de choses. Merci d'avoir facilité mon intégration et de m'avoir redonné courage dans les moments difficiles et surtout merci de ne pas avoir désespéré avec l'étrangère « *pas très futée* ». (J'espère qu'on se reverra durant les vacances en Espagne avec beaucoup de soleil !!!).

Merci beaucoup à tout ceux d'URBM pour votre accueil et pour m'avoir permis de me sentir bien parmi vous. Je n'oublierai jamais l'aide et la patience que vous m'avez accordés.

J'aimerais remercier très spécialement les mémorants (Tom: merci pour avoir été avec moi dès le premier jour de mes TP. Je ne l'oublierai pas. Lionel: merci pour ton aide et tes « *je t'en pRRRrie* ». Math: merci pour tes conseils. Dédé: merci pour t'être intéressé à moi. Blondine: merci de m'avoir fais sourire). Ceux-ci ont partagé avec moi durant toute l'année et encore maintenant les moments difficiles, mais aussi gratifiants que sont les développements de mémoires.

Merci à ma famille, et surtout à ma maman Pili et mon papa José, d'avoir rendu possible cette aventure en Belgique et de m'avoir donné tant d'encouragements lors des pires moments de ce développement de mémoire (Os quiero mucho, mua !). Merci aussi à ma petite sœur Sofia, pour m'avoir donné l'impression d'être la personne la plus grande et admirable du monde! ☺. Merci.

Merci à mes cokoteurs belges de m'avoir aidé dès le premier jour, de m'avoir enseigné la langue française. Merci de m'avoir donné vos encouragements et surtout lors des derniers jours. Et un spécial merci à ma petite polonaise qui m'a tant appris. Je ne t'oublierai pas.

Cette année a été très enrichissante pour moi et c'est grâce à mes nouveaux amis européens si cela a été possible. A tous les ERASMUS, merci !!!.

Je n'oublierai pas d'accorder le plus fort remerciement à la personne qui m'a supportée pendant 9 longues années et qui m'a prêtée son appui inconditionnel dans ma décision d'avoir passé cette année en Belgique. Il m'a donné les plus précieux encouragements. Merci à la seule personne qui puisse me supporter. Edu, je t'aime !!!.

Finalement j'aimerais adresser le dernier remerciement mais non le moindre, aux membres du jury qui ont consacré leur temps à lire et à apporter la rigueur scientifique à ce mémoire.

INTRODUCTION	1
1. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS, LE BACILLE DE LA TUBERCULOSE HUMAINE	2
<i>L'infection de Mycobacterium tuberculosis</i>	3
<i>Traitement de la tuberculose</i>	7
<i>Vaccins contre la tuberculose</i>	7
2. PAROI DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.....	9
3. UDP-GALACTOFURANOSE (UDP-GLF), UN CONSTITUANT ESSENTIEL DE LA MEMBRANE DES MYCOBACTÉRIES	10
4. L'UGM.....	12
<i>Les hypothèses de mécanisme d'action de l'UGM</i>	13
<i>Choix des mutants</i>	14
OBJECTIF DU TRAVAIL	16
5. OBJECTIF DU TRAVAIL.....	17
RESULTATS	18
1. CHOIX DES MUTATIONS	19
1.1.1. L'arginine 278.....	19
1.1.2. L'histidine 59.....	21
1.1.3. La méthionine 349	21
2. STRATÉGIE	22
<i>Préparation du plasmide pMLD200</i>	22
<i>Mutagenèse du gène glf</i>	23
2.1.1. Choix de la séquence des primers pour les PCR 1 et 2	25
2.1.2. Réalisation de la mutagenèse (PCR 1 et 2).....	26
2.1.3. Union des deux fragments mutés du gène <i>glf</i> (PCR 3)	27
2.1.4. Séquençage des fragments PCR 3.....	29
2.1.5. II.2.4. Ligation des allèles mutés dans le vecteur de surexpression pMLD200.....	30
3. SUREXPRESSION DES L'UDP-GALACTOFURANOSE MUTASE MUTÉES DANS <i>E. COLI</i> BL21	32
<i>Surexpression de protéines recombinantes</i>	32
3.1.1. Purification des UGM mutées par colonne IMAC :.....	33
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	37
1. DISCUSSION GENERALE	38
<i>Discussion des résultats</i>	39
2. PERSPECTIVES	40
MATERIEL ET METHODES	42
1. MATERIEL.....	43
<i>Souches et plasmides</i>	43
1.1.1. Souches :.....	43
1.1.2. Plasmides :.....	43
<i>Solutions et milieux</i>	43
1.1.3. Solutions :.....	43
1.1.4. Antibiotiques, IPTG et X-gal :.....	45
1.1.5. Milieux de culture :.....	45
2. MÉTHODES	45
<i>Techniques relatives à l'utilisation d'ADN</i>	45
2.1.1. Extraction d'ADN plasmidique :.....	45
2.1.2. Restriction d'ADN plasmidique purifié :.....	46
2.1.3. Ligation :.....	47
2.1.4. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose.....	47
2.1.5. Purification sur gel d'agarose	47
2.1.6. Polymerase chain reaction (PCR)	47
2.1.7. Séquençage	48
<i>Techniques relatives à l'utilisation de bactéries</i>	49
2.1.8. Préparation de cellules compétentes	49
2.1.9. Transformation bactérienne par choc thermique.....	49
2.1.10. Transformation bactérienne par choc électrique	50
2.1.11. Test blanc/bleu.....	50
<i>Techniques relatives à l'utilisation de protéines</i>	50
2.1.12. La surexpression de l'UGM dans <i>E.coli</i>	50
2.1.13. La lyse cellulaire.....	51
2.1.14. Purification de l'UGM.....	51

2.1.15. La purification par chromatographie IMAC	51
2.1.16. Vérification de la pureté et caractérisation.....	51
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	53
1. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	54

INTRODUCTION

1. Mycobacterium tuberculosis, le bacille de la tuberculose humaine

Mycobactérie est une bactérie aérobie stricte. Il s'agit d'un bacille immobile fin, rectiligne ou plus ou moins incurvé, aux extrémités arrondies. Il n'a pas de capsule et ne sporule pas. Les formes pathologiques sont isolées ou en petits amas. En culture, on peut rencontrer des formes coccoïdes ou filamenteuses (cordes, torsades).

Le genre *Mycobacterium* appartient à la famille des *Mycobacteriaceae*, de l'ordre des *Actinomycetales*. Certains *Mycobacterium* sont des mycobactéries pathogènes pour l'homme, c'est le cas par exemple de *Mycobacterium tuberculosis*, de *Mycobacterium bovis* et de *Mycobacterium leprae*. Certaines formes sont dites atypiques, c'est-à-dire qu'elles sont occasionnellement pathogènes, c'est le cas entre autres de *Mycobacterium avium* et de *Mycobacterium xenopi*. Certains, enfin sont saprophytes.

Mycobacterium tuberculosis est une forme pathogène, responsable de la tuberculose humaine (bacille de Koch). Elle est mise en évidence grâce à la coloration de Ziehl-Neelsen car elle possède des propriétés d'acido-alcool-résistance (Figure 1). Ces propriétés expliquent également la coloration Gram "insuffisante" de *M. tuberculosis*. De plus, elle est sensible aux agents physiques comme les rayonnements ionisants, les UV et la lumière. Par contre, sa sensibilité aux agents chimiques est variable : elle est détruite par l'alcool à 70°, mais résiste à de nombreux antiseptiques, aux bases et aux acides dilués.

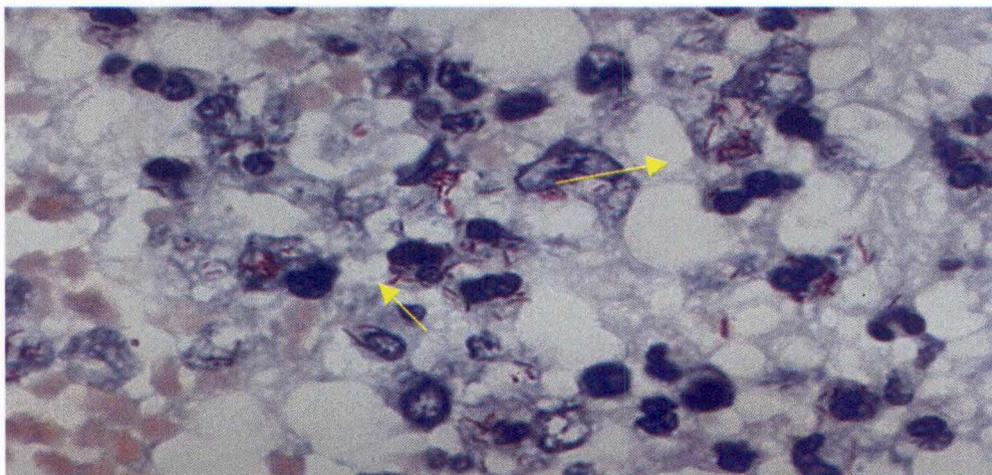


Figure 1. Coupe histologique d'alvéoles pulmonaires infectées par *M. tuberculosis* (flèches jaunes), avec la coloration de Ziehl-Neelsen ([http:// www-medlib.med.utah.edu](http://www-medlib.med.utah.edu)).

La tuberculose est connue depuis des siècles, des textes anciens sur la tuberculose sont retrouvés dans des civilisations méditerranéennes, orientales, extrême-orientales et aussi sur des poteries de l'Amérique précolombienne. La première approche scientifique est réalisée au début du XIXème siècle par Laennec. En 1882, **Robert Koch** découvre la nature bactérienne de la tuberculose.

La tuberculose est une des plus grandes infections mondiales (avec le SIDA et la malaria). En 1993, la gravité de la situation a conduit l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à déclarer que des mesures urgentes devaient être prises par les autorités en matière de lutte contre la tuberculose. Des mesures radicales doivent être prises maintenant avant que les prévisions alarmantes ne se transforment en une réalité tragique. Il a été estimé qu'un tiers de la population mondiale est infectée par ce bacille. Chaque année, il est responsable du développement de la

Estimated Tuberculosis Cases - 2001

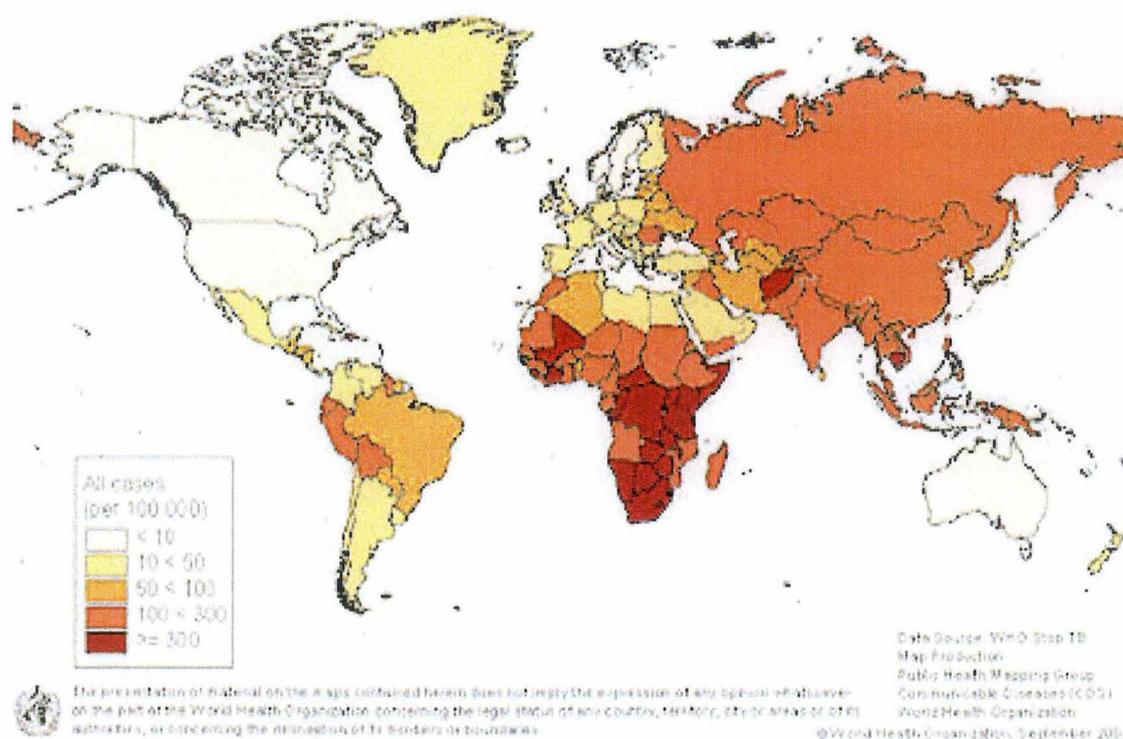


Figure 2. Distribution mondiale de la tuberculose en 2001
(<http://www.who.int/GlobalAtlas>).

tuberculose chez 8 millions de personnes et du décès de 1.8 millions de malades. Approximativement 80% des cas de tuberculose sont trouvés dans 23 pays et la plus part des cas viennent d'Afrique et le sud-ouest de l'Asie (Figure 2). La situation s'est empirée, en Afrique ces deux dernières décennies avec la montée de l'épidémie de HIV/AIDS (Figure 3) et dans l'est de l'Europe, en association avec la résistance multiple à différentes drogues (Lee R. E. 1999).

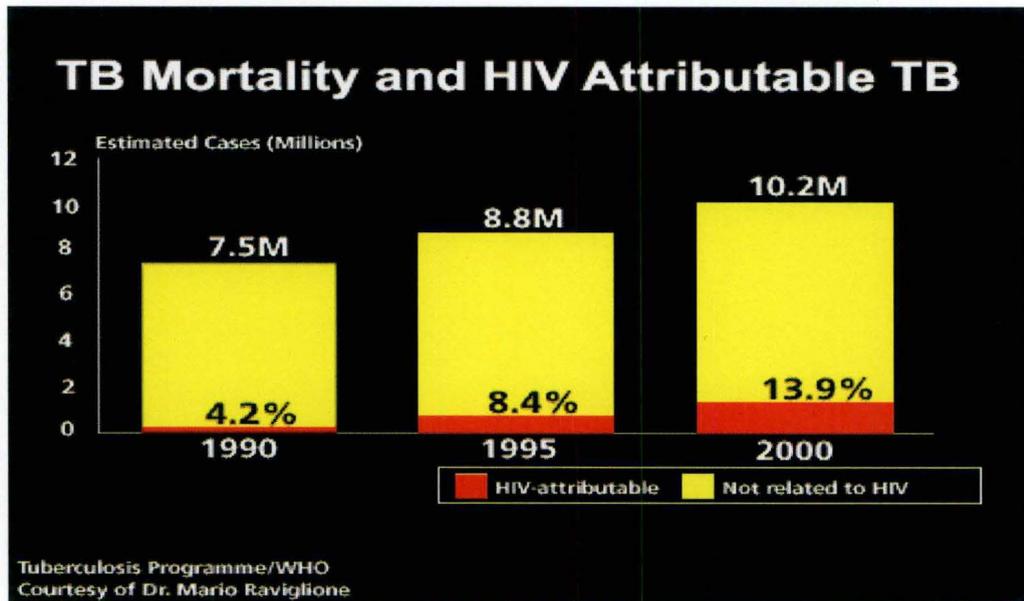


Figure 3. Evolution du pourcentage de mortalité induite par la tuberculose chez les individus immunodéprimés atteints par le virus d'immunodéficience acquise (VIH) (http://www.psi.org/our_programs/tb.html).

Le Bacille de Koch est un agent pathogène strictement humain et dont la forme pulmonaire est la plus courante. Principalement, la propagation se fait à partir des sécrétions bronchiques (transmission par voie aérienne). Les personnes atteintes peuvent alors transmettre l'infection en toussant, éternuant ou tout simplement en parlant. Elles projettent ainsi dans l'air les bacilles tuberculeux et il suffit d'en inhaler quelques-uns pour être infecté.

L'infection de *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis se développe normalement au niveau des poumons, mais on peut le retrouver dans d'autre partie du corps. L'infection se déroule en deux étapes (Figure 4).

- La primo-infection (qui passe généralement inaperçue), est une réaction inflammatoire. En effet, il y a développement d'un granulome bénin sans symptôme chez le patient, jusqu'à ce qu'une immunodéficience lui donne l'occasion de se développer.

- La deuxième phase de l'infection tuberculeuse est le plus souvent liée à une réinfection d'un patient déjà sensibilisé aux antigènes de *Mycobacterium*. Il y aura le développement d'un granulome exubérant avec nécrose des tissus et calcification. Ces lésions peuvent entraîner le décès du patient. Il existe deux types de patients, ceux qui lors de cette deuxième infection ne présenteront pas les symptômes de la tuberculose, car les antigènes sont dissimulés au sein d'un granulome. Et ceux qui développeront les symptômes du à la présence dans le sang des antigènes suite à la lyse cellulaire (Figures 4 et 5).

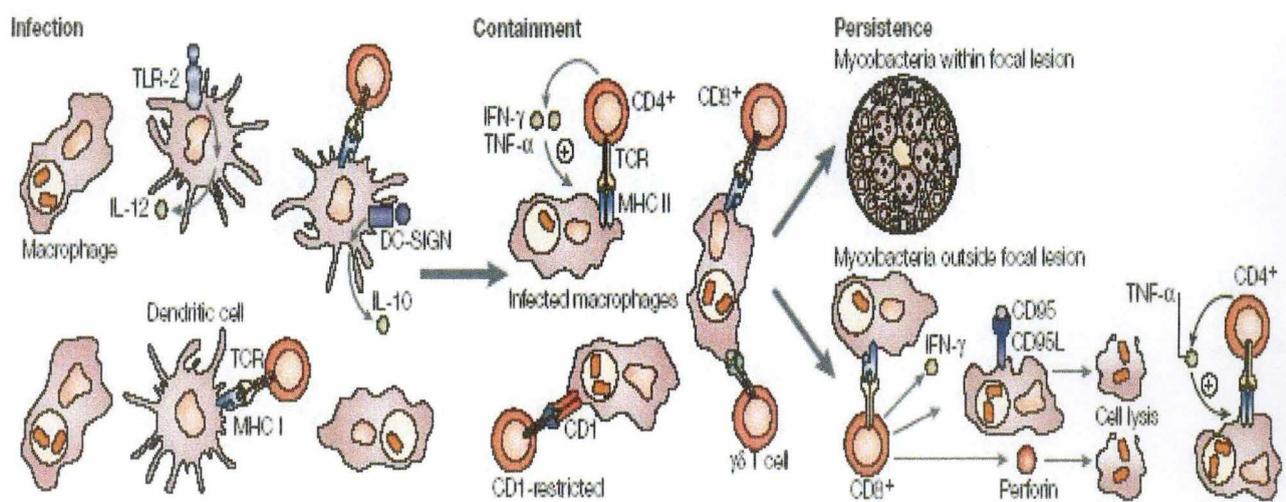


Figure 4. Schéma de la formation du granulome après de qu'un lymphocyte Th1 soit en contact avec un macrophage infecté par *Mycobacterium* et autre voie de lyse cellulaire (<http://pathport.vbi.vt.edu>).

La bactérie peut survivre lors de l'infection chez l'homme grâce à sa paroi très riche en acides lipidiques (plus de 60% de la paroi bactérienne). Ce qui explique sa résistance dans l'environnement extracellulaire, mais également sa résistance partielle à la phagocytose. Une des particularités est de subsister et de se multiplier dans les macrophages, cependant il ne s'agit pas d'une bactérie endocellulaire stricte (Figure 5).

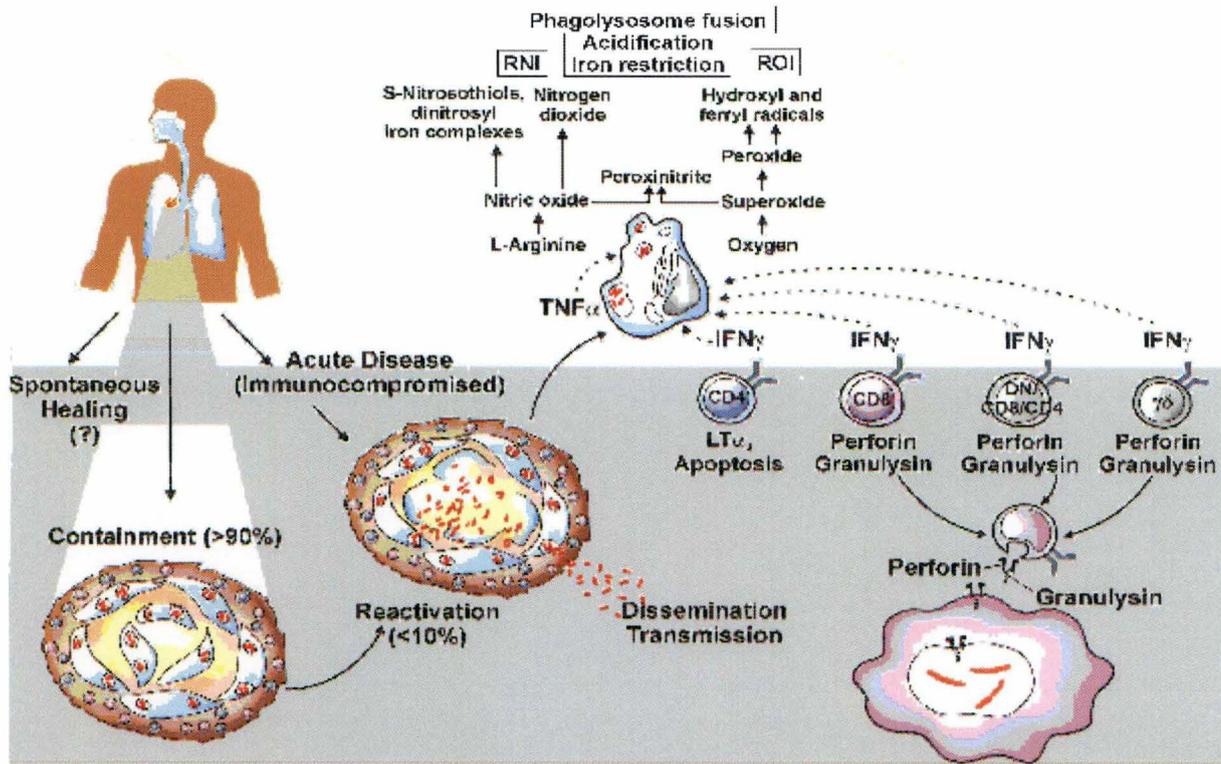


Figure 5. Cours des évènements après l'infection par *Mycobacterium tuberculosis*. La phase aiguë apparaît chez les individus immunodéprimés. Principaux mécanismes effecteurs des macrophages et des cellules de lymphocytes T (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen>).

En cas de contamination par un petit nombre de bacilles tuberculeux, si l'individu possède une bonne immunité naturelle, la multiplication des bacilles est limitée. Après 3 à 6 semaines apparaît un petit tubercule constitué de cellules épithélioïdes et de cellules géantes entourées d'une couronne de lymphocytes. Au centre, une zone de nécrose dite caséuse (caseum) se développe, dans laquelle les macrophages affluent. Ceux-ci phagocytent les bactéries de la zone nécrosée et les regroupent dans une vésicule endocellulaire. Les bacilles se retrouvent donc dans un environnement défavorable car peu oxygéné. Ce qui entraîne la sécrétion de cytokines par le macrophage, aboutissant à l'activation des lymphocytes de la périphérie du granulome. Ces derniers, sécréteront des cytokines provoquant la mort des macrophages infectés. On parle de primo-infection latente, car les antigènes du pathogène restent enfermés dans le granulome.

On observe un développement de l'immunité acquise chez les sujets ayant eut un contact. Celui-ci peut-être du à différents phénomènes : le passage du bacille dans le sang, le contact entre les antigènes et les lymphocytes du granulomes,

Il a été montré que l'arabinogalactane (composant sucré de la paroi mycobactérienne) est un fort inducteur de la libération de TNF (Tumor necrosis factor) qui, avec des autres facteurs,

contribue à l'augmentation des symptômes inflammatoires de la région de l'infection, permettant ainsi la formation du granulome.

En cas d'échec de cette réponse inflammatoire de l'organisme, les ganglions efférents seront envahis par les bacilles, qui essaieront dans tout l'organisme par les voies lymphatiques et sanguines. Les lésions nécrotiques pulmonaires s'étendent et deviennent détectables à la radiographie. L'encapsulation de la nécrose caséuse initiale et sa stérilisation spontanée surviennent dans 90% des cas, sinon l'abcès s'évacue et forme une caverne tuberculeuse ouverte sur les bronches. L'aération entraîne le développement des bacilles. Le malade crache et élimine des bacilles en quantité.

Les lésions observées dans la tuberculose pulmonaire sont dues à l'action toxique des macrophages et des lymphocytes T activés.

M. tuberculosis a développé différentes stratégies pour entrer dans les phagocytes mononucléaires, éviter la réponse cellulaire toxique du phagocyte hôte pendant et après son entrée, et éviter la réponse du système immunitaire entier.

L'interaction entre le macrophage et *Mycobacterium* peut se produire de deux manières. Une spécifique, par l'opsonisation en utilisant des molécules comme :

- Les collectines : Sp-A et Sp-D, qui sont des protéines surfactantes qui se lient au moyen de ses groupes aminés à des polysaccharides.
- Les protéines du complément : principalement C3b, qui se lie de manière non spécifique aux carbohydrates de la surface de *Mycobacterium* et qui est reconnu par les récepteurs CR1 et CR3 des macrophages. La bactérie, au cours de l'évolution, est parvenue à détourner un mécanisme de lutte du macrophage pour lui permettre d'être phagocyté par celui-ci. En effet, *Mycobacterium* induit la formation de C3b modifié, qui permet la phagocytose chez le macrophage mais pas l'activation du complément.
- Les immunoglobulines (principalement les IgG): il ne s'agit pas de la voie la plus utilisée par les mycobactéries car la quantité d'IgG nécessaire est plus importante que celle de C3b. Mais cette voie confère l'avantage d'avoir un accès plus rapide à la ferritine, qui est abondante dans les lysosomes et qui leur garantit l'apport en fer nécessaire à son métabolisme.

On peut aussi avoir une interaction directe entre le macrophage et *Mycobacterium*, c'est-à-dire sans opsonisation. Seulement par la reconnaissance de (Figure 6) :

- Carbohydrates de surface (comme le lipoarabinomannane).
- Récepteurs Toll-like (TLR) : surtout le TLR-2 qui reconnaît diverses molécules de

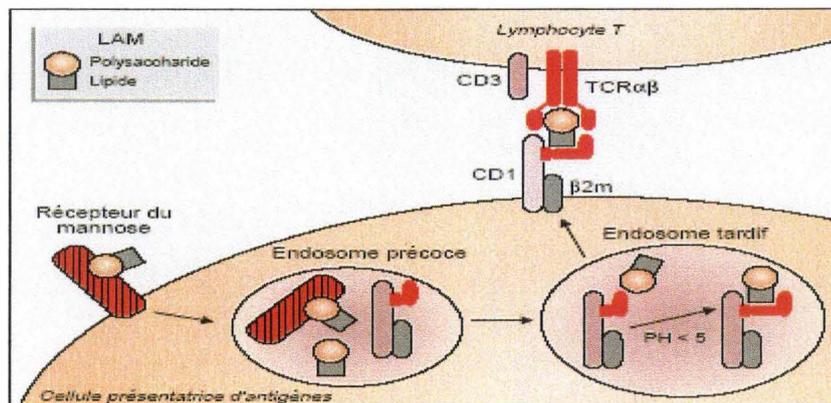


Figure 6. Trafic intracellulaire du LAM et présentation du LAM par le récepteur CD1 aux lymphocytes T (<http://ist.inserm.fr>).

surface des mycobactéries. Ce TLR est capable de polariser la réponse des lymphocytes Th via la production de l' Interleukine 12 (IL-12), une cytokine pro-Th1 et l'induction de la production d'oxyde nitrique, un mécanisme bactéricide.

- Récepteurs au mannose (très important pour la survie de la bactérie).
- Récepteurs scavenger (surtout le récepteur scavenger de classe A, qui va se lier aux sulfolipides de *Mycobacterium*).

Il y a des récepteurs qui ne sont pas liés directement à l'activation de mécanismes bactéricides, spécialement ceux en rapport avec le complément (CR1 et surtout le CR3), qui paradoxalement sont utilisés comme stratégie de survie, car ils permettent le passage à l'intérieur des macrophages sans l'activation des composants du complément.

Une des principales molécules de surface de *Mycobacterium* est le lipoarabinomannane (LAM), qui va interagir avec les récepteurs au mannose situés en surface des macrophages. Des petites modifications de certains sucres de cette arabinomannose, n'induisent pas nécessairement des mécanismes bactéricides (c'est le cas de quelques souches virulentes). En utilisant ces récepteurs au mannose, ils n'y pas de production d'espèces d'oxygène réactive. En effet, il a été démontré qu'il n'y a pas d'activation de la NADPH oxydase et donc pas de maturation complète du phagosome (Sthal P D. 1998), et ce qui fait de cette entrée une voie de pénétration sûre pour la mycobactérie. En plus, l'entrée via les récepteurs mannose des souches virulentes, évite la production d'Interleukine 12 (IL-12), ce qui contribue à la persistance de l'infection en évitant l'orientation des lymphocytes Th vers une réponse Th1.

Les protéines surfactantes Sp-A et de Sp-D, qui ont une activité opsonisante peuvent également être reconnues par ces récepteurs au mannose. Ce qui permet une interaction rapide entre le macrophage et bactérie. Ce qui par conséquent augmente la capacité d'infection de *M. tuberculosis* car ces protéines surfactantes se trouvent principalement dans les voies aériennes distales et les alvéoles pulmonaires, où l'on retrouve habituellement la bactérie.

Une question qui vient directement à l'esprit est comment les mycobactéries arrivent à survivre à l'intérieur du macrophage et de quelle façon ils évitent l'action lytique de ceux-ci. Cette survie est peut-être due au fait que l'on retrouve dans les phagosomes contenant les mycobactéries vivantes, une protéine, la TACO (*Tryptophan Aspartate-Containing Coat*). La fonction de cette protéine, présente dans la membrane des phagosomes, est probablement d'éviter la fusion du phagosome contenant les mycobactérie vivantes avec le lysosome, mais le mécanisme n'est pas encore complètement connu (Ferrari G 1999). De cette manière, elles peuvent se développer normalement dans le macrophage sans subir l'action lytique de celui-ci. Quand les bactéries mourront, la TACO sera libéré et le phagosome pourra fusionner avec le lysosome. Lors de l'entrée des mycobactéries dans le macrophage, il va y avoir sécrétion de facteurs ou signal transmembranaire qui vont permettre de maintenir la TACO dans la membrane du phagosome.

Pour permettre l'action des protéases, le phagosome doit être acidifié, ce qui est permis par l'activation d'une pompe à protons transmembranaire. Or, les mycobactéries vivantes provoquent le dysfonctionnement de cette pompe à protons transmembranaire évitant ainsi l'action des protéases.

En conclusion, *M. tuberculosis* a la capacité d'utiliser sélectivement les récepteurs spécifiques du macrophages qui lui confèrent un avantage dans la survie intracellulaire (Trejo H. 2003). De plus, les chaînes de sucres de la paroi jouent un rôle primordial dans l'infection. En effet, c'est notamment les variations au sein de ces chaînes qui détermine le caractère virulent ou non de ces souches.

Traitement de la tuberculose

Le traitement le plus efficace est la chimiothérapie antibiotique. Dans la plupart des cas, le patient est guéri. *M. tuberculosis* est sensible aux antibiotiques en association comme l'isoniazide, rifampicine, streptomycine, éthambutol et pyrazinamide. L'utilisation d'agents chimiothérapeutiques comme l'isoniazide et l'éthambutol se base sur le fait qu'ils vont inhiber spécifiquement la biogenèse des composants de la paroi bactérienne et empêcher ainsi la survie des mycobactéries. (Blanchard J.S. 1996)

Malheureusement on a vu récemment l'apparition de souches multirésistantes : résistances à l'isoniazide (INH) et à la rifampicine. L'émergence des souches résistantes à ces traitements force le milieu scientifique à stimuler la recherche pour trouver de nouvelles stratégies chimiothérapeutiques.

Le traitement de la tuberculose se divise en deux phases. Plusieurs médicaments doivent être associés pour obtenir la régression et l'extinction des foyers infectieux:

- La première phase se déroule en 8 semaines avec deux médicaments (habituellement le rifampicine et l'isoniazide) qui vont attaquer la vitesse de réplication de la mycobactérie dans les macrophages.
- La deuxième phase se termine avec l'utilisation d'autres antibiotiques durant plusieurs mois.

Vaccins contre la tuberculose

Le vaccin contre la tuberculose est un bacille appelé Calmette-Guérin. L'histoire de ce bacille de Calmette-Guérin (BCG) commence en 1908 quand Albert Calmette et Camille Guérin ont entamé leur travail à partir d'une souche virulente de *Mycobacterium Bovis* appelée Lait Nocard, celle-ci avait été isolée par Nocard à partir d'une vache atteinte de mammite tuberculeuse. Calmette et Guérin l'ont mise dans un milieu additionné de bile bovine pour assurer une meilleure homogénéisation de la culture. La souche a perdu sa virulence après d'un grand nombre de passages en culture. En 1921, on a employé pour la première fois en France le BCG par voie orale à des fins de vaccination. Depuis lors, on a administré plus de 3 milliards de doses dans le monde. Le BCG a été incorporé dans le schéma de vaccination infantile du Programme de Vaccination. En 1982, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) dans un effort pour limiter la variabilité génétique entre des souches de BCG, donne au "Statens Seruminstitut" à Copenhague la responsabilité du contrôle de qualité des vaccins de BCG et supervise la standardisation du BCG.

Le vaccin est contre-indiqué chez des patients atteints du SIDA. Le vaccin de BCG est généralement administré pour se prémunir contre la tuberculose provoquée par *M. tuberculosis* ; toutefois, on a aussi trouvé un large effet protecteur contre la lèpre qui va de 20% jusqu'à 80% ; il y a également des preuves que le BCG apporte une certaine protection contre l'infection par *M. ulcerans* et contre les maladies glandulaires imputables à d'autres mycobactéries, en particulier *M. Avium* intracellulaire.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la variabilité dans l'efficacité de ce vaccin. Une de celles-ci est qu'une infection avec une mycobactérie non tuberculeuse confère une protection contre la tuberculose provoquée par *M. tuberculosis* active, mais les groupes en contact avec des infections naturelles provoquées par mycobactéries non pathogènes, ont une susceptibilité aux mycobactéries pathogènes qui peut diminuer. Ceci a été démontré dans des essais effectués dans des secteurs où les mycobactéries non tuberculeuses étaient prédominantes, en donnant comme résultat une faible efficacité du vaccin.

Des différences dans la puissance ou l'immunogénicité des souches du vaccin, ainsi que la génétique de l'hôte, peuvent faire varier l'efficacité de celui-ci. En modèle animal, des études démontrent qu'un régime déficient en protéines modérément chronique, peut affaiblir la capacité du vaccin à protéger contre la tuberculose provoquée par *M. tuberculosis*. Chez ces animaux, le BCG protège contre la dissémination du microorganisme à partir du foyer d'infection. Des études démontrent une diminution de l'efficacité du vaccin avec l'âge, fait qui peut être dû à ce que un individu vieux a plus de possibilités d'entrer en contact avec des mycobactéries, ce qui pourrait interférer ou masquer les effets du BCG. Le vaccin peut être plus efficace pour se protéger de la forme pulmonaire de la maladie que contre la réactivation de celle-ci. La tuberculose pulmonaire peut résulter de la réactivation d'une infection latente de *M. tuberculosis*, d'une réinfection ou la progression de l'infection primaire. Ces mécanismes de pathogénicité peuvent être influencés dans une moindre mesure proportion par la vaccination avec BCG. Étant donné le peu de protection du BCG contre la forme pulmonaire de la tuberculose, cette maladie est une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, surtout dans les pays moins industrialisés, il est nécessaire de trouver un nouveau vaccin protecteur vis à vis de la forme pulmonaire de la maladie.

On estime actuellement qu'il y a plus de 268 vaccins candidats, parmi ceux-ci les plus importants sont les vaccins recombinants et vaccins à ADN.

On essaie de produire de nouveaux vaccins par la technique d'ADN recombinant afin de modifier le BCG ou *M. tuberculosis* et d'obtenir ainsi un nouveau vaccin atténué contre la tuberculose. Une de ces méthodes consiste à exprimer une variété d'antigènes hétérologues en BCG. Si on peut identifier les antigènes clés de *M. tuberculosis*, et les exprimer en BCG, ceci donnerait un vaccin vivant atténué plus efficace. D'autre part, éliminer les gènes de virulence ou responsables de la survie dans les macrophages, de *M. tuberculosis* est une bonne stratégie pour développer un vaccin vivant atténué. On a aussi essayé d'obtenir des vaccins peptidiques efficaces avec des antigènes spécifiques qui doivent être identifiés, leur potentialité à induire une immunité protectrice doit encore être confirmée. Le facteur le plus essentiel, est probablement d'obtenir la présentation antigénique appropriée, et ceci pourrait facilement se produire avec certaines protéines. *Mycobacterium tuberculosis* est connu pour exprimer de protéines, comme celles du complexe 85 environ 30/32 kDa. Toutes ont la capacité de promouvoir une réponse proliférative de cellules T humaines. Une des stratégies pour le développement d'un vaccin plus efficace est l'incorporation de multiples antigènes mycobactériens qui stimuleront ces cellules T.

Les vaccins à ADN sont une autre stratégie dans la recherche de nouveaux vaccins contre la tuberculose. Généralement, ces vaccins d'ADN incluent l'utilisation d'ADN nu qui encodent plusieurs antigènes spécifiques dans une solution tampon ou un vecteur viral, mais il faut toutefois prendre garde à ce que ces antigènes n'interfèrent pas avec les essais de intradermo-réaction. La sélection de l'antigène utilisé dans les vaccins à ADN est limitée par l'immunogénicité de la protéine. L'immunogénicité de 2 antigènes de *Mycobacterium tuberculosis* ont été prouvées : la protéine de choc thermique 65 (hsp65) et antigènes 85 (Ag 85). Les protéines du choc thermique sont des antigènes reconnus dans les réponses immunes à pathogènes intracellulaires, y compris les mycobactéries. L'Ag 85 est un complexe qui appartient à un groupe de protéines sécrétées par les

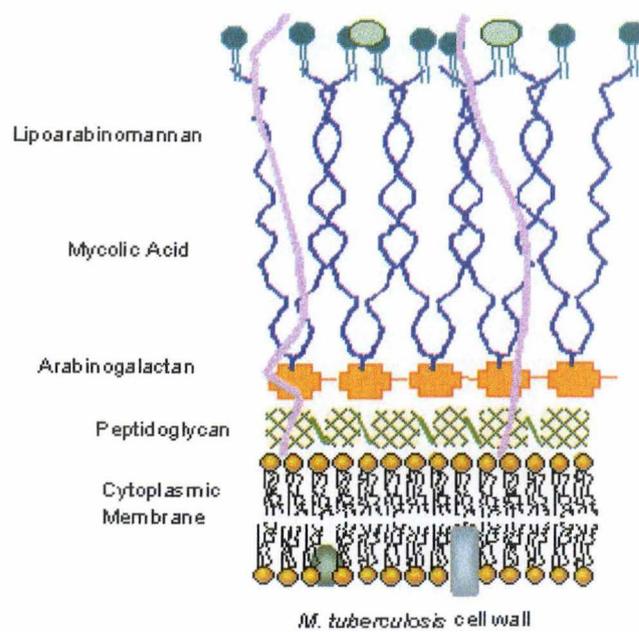


Figure 7. Paroi de *Mycobacterium tuberculosis*.
 Les acides mycoliques sont liés à l'arabinogalactane, lui-même lié au peptidoglycane de la paroi. (http://www.ratsteachmicro.com/Mycobacteria_notes)

mycobactéries, ces antigènes stimulent précocement et fortement la réponse cellulaire en modèles murin et humain infectées avec *M. tuberculosis*. Dans une étude qui a utilisé l'ADN codant pour l'Ag 85 afin d'immuniser des souris, on a pu observer une diminution de la multiplication de *Mycobacterium tuberculosis*, ce résultat est semblable à celui obtenu dans des souris vaccinées avec le BCG. La réponse cellulaire et humorale induite par ce vaccin à ADN indique une réponse de type Th1, cette dernière est nécessaire pour la protection immunologique contre *M. tuberculosis* (Rivas-Santiago B. 2005).

2. Paroi de *Mycobacterium tuberculosis*

La paroi des mycobactéries et en particulier de *M. tuberculosis* a une structure différente de toutes les autres bactéries, due à la présence d'acides mycoliques. Ceux-ci sont des longues chaînes lipidiques qui vont isoler fortement la bactérie de l'environnement où elle se trouve. De plus, ils vont interagir avec le système immunitaire inné et permettre aux bactéries d'approcher des macrophages (Figures 7 et 8).

Une grande partie du génome de *M. tuberculosis* code pour des enzymes impliquées dans le métabolisme de lipides, lesquels sont à l'origine des particularités de la paroi.

Ces acides mycoliques sont associés avec des glycolipides tels que le dimycolate α,α' -trehalose (TDM) et le monomycolate α,α' -trehalose (TMM). On a pu observer que des membres du complexe 85, appelé Antigène 85 (Ag85) sont impliqués dans l'échange des acides mycoliques de la paroi des mycobactéries.

Cette protéine exportée, l'Ag85, a une forme de triade (A, B et C). Chacun est également impliqué dans la pathogénicité de la maladie par ses capacités de liaison de la fibronectine. Un domaine de carboxylestérase a été trouvé dans les séquences des acides aminés d'Ag85 A, B, et C, et chaque protéine agit comme une mycolyltransferase impliquée aux étapes finales de construction de la paroi mycobactérienne. En plus, l'utilisation d'un antagoniste (6-azido-6-deoxy-, -trehalose) démontre que ces protéines sont les cibles essentielles et potentielles pour de nouveaux médicaments antimycobactériens. (Belisle J. T. 1997).

Il a été démontré que lorsque cette protéine est libérée dans les macrophages infectés, les cellules T CD8⁺ vont les reconnaître. Cette reconnaissance aura pour effet la libération de cytokine comme l'IFN- γ , qui active les macrophages eux-mêmes (Rivas-Santiago B. 2005).

C'est par cette propriété de marquage des macrophages infectés et de déclenchement de lyse cellulaire, qu'on a pensé à cette molécule comme antibiotique potentiel. On l'a aussi considérée comme vaccin par l'action qu'elle exerce dans la synthèse de la paroi cellulaire (surtout l'Ag85 B). Toutes ces propriétés démontrent l'importance de cette molécule.

Ces acides mycoliques sont liés à la paroi bactérienne par des chaînes galactanes. Celles-ci sont constituées par la répétition d'unités d'UDP-Galactofuranose (UDP-Galf) liées entre elles par des liens glycosidiques β successivement 1 \rightarrow 5 et 1 \rightarrow 6.

L'enzyme qui réalise la liaison entre les chaînes galactanes et les acides mycoliques (Figures 7 et 8) est l'UDP-Galactopyranose mutase (UGM). L'UDP-Galf joue un rôle essentiel dans le développement des parois mycobactériennes. Il a en effet été montré que celles-ci ne pouvaient survivre sans ce composant. (Caravano, A(2003)).

On a aussi pu démontrer qu'en faisant un mutant (sensible à la température) du gène *glf* (pour l'UDP-Galactopyranose mutase), qu'il n'y aura pas d'UDP-Galf. Or ce caractère est essentiel pour la survie de la bactérie puisqu'en absence de celui-ci, elle meurt. (Sanders D. A. R. 2001). Il y

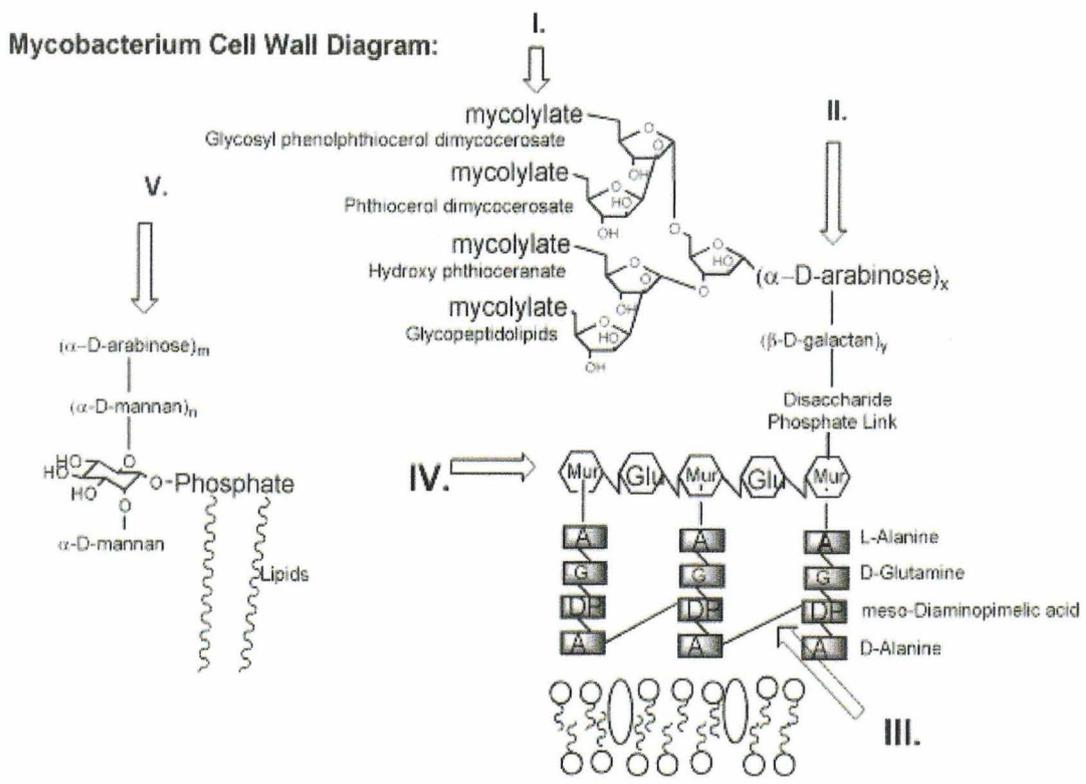


Figure 8. Description moléculaire de la paroi bactérienne où sont ancrées des chaînes arabinogalactanes (squelette galactose qui comporte des ramifications arabinose) (V), sur lesquelles sont fixés des acides mycoliques (I). Le peptidoglycane (III) est un polymère de glycosaminopeptides où la N-acétylglucosamine (NAG) et l'acide N-acétylmuramique (NAM) sont liés par des liaisons osidiques (IV). Le chaîne de Galactofuranose se trouve dans de D-galactan (II) (<http://connection.lww.com>).

a aussi ces sucres dans la composition du Lipopolysaccharide (LPS) de la paroi, en particulier dans l'antigène O spécifique, épitope antigénique (Figure 9). Cette région ne sera pas pareille chez différentes bactéries. Ces différences vont donner la spécificité d'interaction avec des macrophages et les molécules du complément, et conditionner donc sa virulence. Les gènes qui codent pour la construction des sucres de la chaîne D-galactan de cet antigène O, sont dans le complexe de six gènes : *rfbD_{KPO1}* qui a été démontré qui codent pour l'UDP-galactopyranose mutase. (Koplin R. 1996).

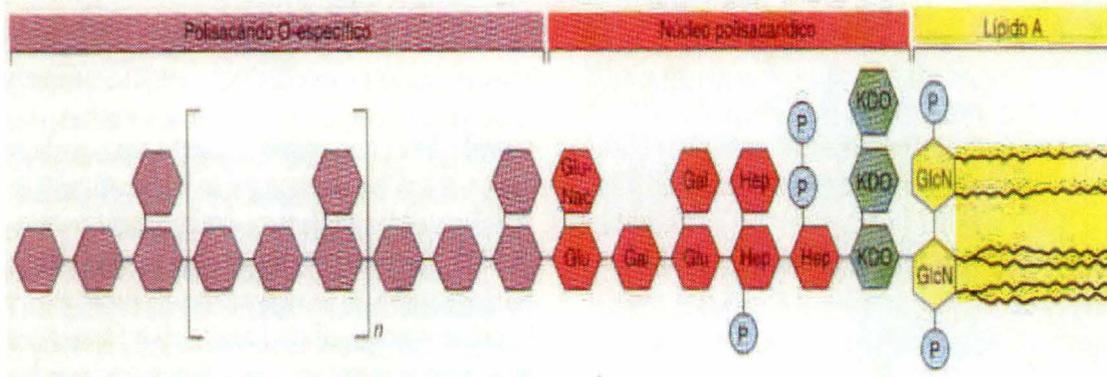


Figure 9. Schéma représentant le LPS de la paroi des mycobactéries. Il se compose de trois parties : en jaune, le lipide A qui est un dimère de $\beta 1 \rightarrow 6$ glucosamine qui permet la fixation au céto-désoxyoctane (KDO). Ensuite en rouge, le coeur, qui est la partie polysaccharidique et qui est composée de glucose et galactose. Enfin en violet, les chaînes latérales (O) qui confèrent la spécificité antigénique. Ces dernières sont des chaînes de sucres à 6 carbones (<http://es.geocities.com/joakinicu>).

Compte tenu de l'occurrence de ce sucre rare chez divers pathogènes et vu son importance dans l'interaction avec les macrophages pour déclencher l'infection, il est évident qu'une meilleure compréhension de la biosynthèse (et de l'enzyme qui catalyse sa biosynthèse), ainsi que la connaissance de l'incorporation dans les biopolymères de l'UDP-Galactofuranose, pourrait être exploitable afin de lutter contre cette maladie infectieuse.

3. UDP-Galactofuranose (UDP-Glf), un constituant essentiel de la membrane des mycobactéries

Aucune nouvelle famille d'antibiotiques n'a été découverte depuis plus de trente ans. Pourtant, sous la pression de sélection exercée par les antibiotiques censés les anéantir, les bactéries n'ont cessé d'évoluer et de trouver des parades fort ingénieuses pour se dérober à leur action. L'émergence du phénomène de multi-résistance aux antibiotiques courants de la pharmacopée a conduit à la recherche de molécules spécifiques aux microorganismes pathogènes et à une cible chimiothérapeutique potentielle, l'UDP-galactopyranose mutase responsable de l'isomérisation de l'UDP-galactopyranose en UDP-galactofuranose (UDP-Galf) (Figures 10 et 11).

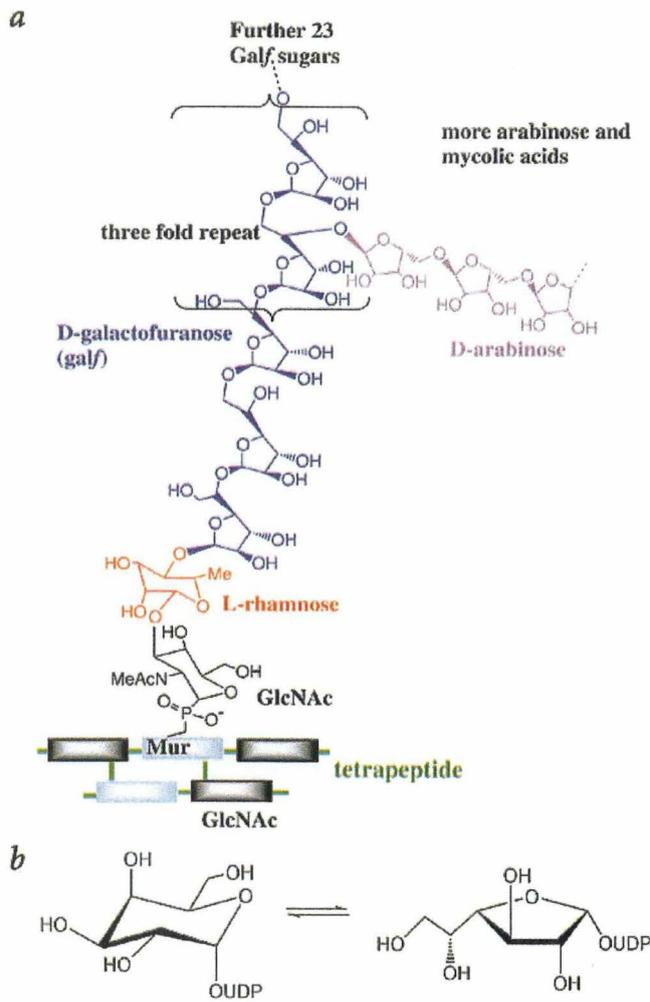


Figure 10. a) Les chaînes de galactofuranose (galf) sont un des constituants de la paroi bactérienne. b) Réaction d'isomérisation de l'UDP-galactopyranose (UDP-galp) en UDP-galactofuranose (UDP-galf) (<http://www.nature.com/nsmb/journal>).

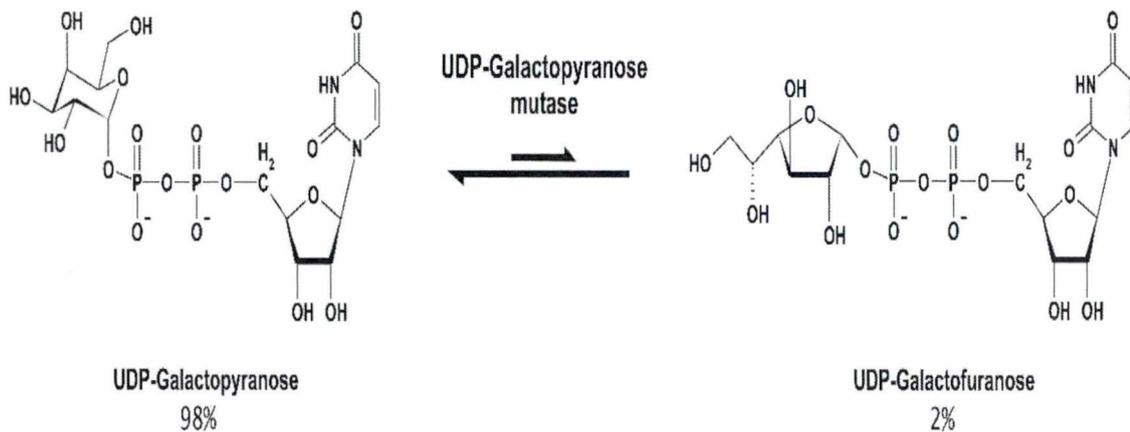


Figure 11. L'UDP-galactopyranose mutase catalyse l'isomérisation de UDP-Galp en UDP-Galf. *In vitro*, cette réaction est déplacée vers la formation de l'UDP-galp. Par contre, la formation de l'UDP-galf est favorisée *in vivo*, par sa prise en charge immédiate par l'UDP-galactofuranose transférase. (<http://www.biochem.wisc.edu/kiessling>).

En effet, ce sucre est présent sous forme de pyranose chez les eucaryotes supérieurs mais la forme furanose n'a été détectée que chez certains microorganismes, tels que des bactéries et mycobactéries comme *Klebsiella*, *Nocardia*, *Mycoplasma* et *Clostridium*, et des protozoaires comme *Leishmania* et *Trypanosoma*, aussi chez champignons comme *Penicillium* et *Aspergillus* (Koplin R. 1996). Beaucoup de ces microorganismes sont d'importants pathogènes, ce qui fait de l'enzyme UDP-galactopyranose une cible thérapeutique potentielle. La caractérisation structurale de cette enzyme ainsi que l'élucidation de son mécanisme catalytique devraient conduire à des informations essentielles permettant la conception de nouveaux antibiotiques. En effet, il paraît évident que les composés qui inhiberaient la fabrication ou l'incorporation de ces unités galactofuranose seraient de remarquables "leads" comme agents antibactériens. On peut pointer ici un travail en cours qui se développe à l'Institut de Chimie Organique et Analytique de l'Université d'Orléans sur la famille des pyrrolidinols (<http://www.univ-orleans.fr>) qui miment la galactofuranose.

D'un point de vue thérapeutique, il est donc intéressant de cibler les enzymes impliquées dans la production de l'UDP-Galf et dans son assemblage en chaînes de galactanes. Dans ce cadre, il est possible d'empêcher l'action de deux enzymes.

Premièrement, l'UDP-Galactopyranose mutase (UGM) : cette enzyme est responsable de l'isomérisation de l'UDP-Galactopyranose (UDP-Galp) en UDP-Galactofuranose (UDP-Galf). Notons que, *in vitro*, cette réaction se déroule plutôt en faveur de la formation de UDP-Galp. Effectivement, à l'équilibre cette réaction engendre des fractions molaires de 98% en UDP-Galp contre seulement 2% en UDP-Galf (Figure 11.).

Deuxièmement, l'UDP-Galactofuranose transférase : elle est capable de former les liens α -1,4-glycosidiques créant ainsi les chaînes galactanes généralement composées de plus de 20 résidus UDP-Galf.

Dans le cadre de ce mémoire, on se focalisera sur l'enzyme qui catalyse la réaction biochimique d'isomérisation de l'UDP-galp en UDP-galf : l'UDP-galactopyranose mutase (UGM).

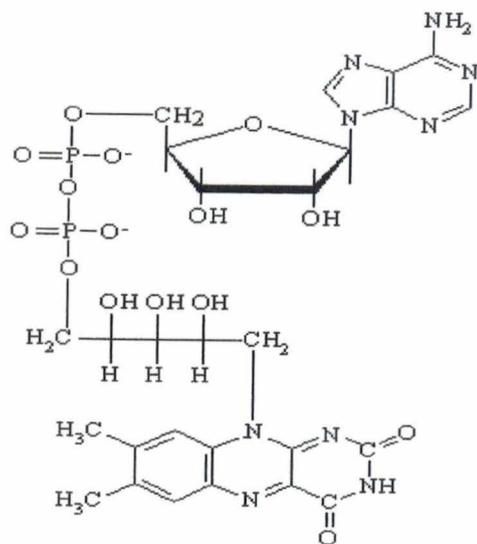


Figure 12. Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) (<http://www.gwu.edu/~mpb>).

4. L'UGM

L'UGM est une flavoprotéine. Elle est caractérisée par une coloration jaune typique avec un spectre d'absorption présentant des pics d'absorbance à 382 et 450nm ainsi qu'un minimum à 465nm, ce qui est caractéristique des cofacteurs flaviniques, coenzymes dérivées de la vitamine B2 (ou riboflavine). Deux formes de flavine sont biologiquement actives : la flavine adénine mononucléotide (FMN) et la flavine adénine dinucléotide (FAD). Elles peuvent se lier de différentes façons à la protéine : elles sont maintenues dans leur site d'interaction soit en formant plusieurs ponts hydrogène avec la protéine, soit en créant des liaisons covalentes avec certains acides aminés de la séquence protéinique. Le cofacteur flavinique de l'UGM est le FAD (Figure 12). Celui-ci se lie à la séquence protéinique par le biais de ponts hydrogène, d'interactions de Van der Waals et d'interactions coulombiennes (principalement au niveau du diphosphate). Il est indispensable à l'activité catalytique, mais son rôle précis reste à clarifier. (Caravano A. 2003).

Les flavines sont caractérisées par un noyau isoalloxazine. D'un point de vue structural, le noyau isoalloxazine est composé d'un tricycle et peut se présenter sous deux formes distinctes : soit sous la forme oxydée qui est plane, soit sous la forme réduite (FADH₂ ou FADH⁻) montrant une courbure due à l'hybridation sp³ des azotes N10 et N5, ce qui lui vaut l'appellation de « forme papillon » (Figure 13). La face représentée à la figure 13. est appelée la face « *si* » par opposition à l'autre côté du cycle appelé face « *re* ».

En outre, l'activité de l'UGM est optimale lorsque le cofacteur flavinique est sous forme réduite. Des analyses potentiométriques ont montré que la forme FADH⁻ est plus stable que la forme FADH₂ dans cet environnement protéinique. (Fullerton S.W. B. 2003)

Le gène codant pour l'UGM a été identifié en 1996 et exprimé chez *E. coli* et *K. pneumoniae*, puis en 1997 chez *Mycobacterium tuberculosis* (Weston A. 1997), sous le nom de Rv3809c. Il a été récemment démontré que c'est un « overlapping » d'un nucléotide sur le gène Rv3808c qui est responsable de la production de la Galactofuranosil transférase. Le gène Rv3809c code donc à la fois pour l'UDP-Galactopyranose mutase et la Galactofuranosil transférase, deux enzymes essentielles pour les mycobactéries, telles que *Mycobacterium tuberculosis*.

Plusieurs structures résolues par diffraction de rayons X sont disponibles dans la banque de données de Brookhaven (PDB) (Protein Data Bank : <http://www.rcsb.org>). On trouve ainsi l'enzyme cristallisée en présence du FAD sous forme oxydée dans le cas de la mutase d'*E. coli* (Sanders D. A. R. 2001) et de *M. tuberculosis* et *K. pneumoniae* (Beis K. 2005). Une structure reprend également l'enzyme avec le cofacteur flavinique sous forme réduite. Il s'agit, dans ce cas, de l'UGM de *K. pneumoniae* (Beis K. 2005). L'UGM se présente sous la forme d'un homodimère et est caractérisée par un poids moléculaire d'environ 44 kDa par monomère. Chaque monomère (Figure 14) est constitué de 367 résidus et comporte un site actif incluant le FAD. On peut le diviser en trois domaines : (Sanders D. A. R. 2001)

- Le Domaine 1 est constitué de 4 feuillets β parallèles (cette structure stabilisant le FAD) et d'une structure présentant successivement une hélice α , un feuillet β et une hélice α aussi appelée structure $\alpha\beta\alpha$ -Rossmann Fold.
- Le Domaine 2 comprend un feuillet β antiparallèle composé de 6 brins.
- Le Domaine 3 est caractérisée par 5 hélices α .

Les domaines 2 et 3 sont impliqués dans la dimérisation de l'UGM. La cohésion entre les deux monomères est assurée par des ponts hydrogène. On peut voir sur la figure 15 que le site actif s'étend dans la fente formée entre les domaines 1 et 2 qui permet l'insertion du substrat au sein de l'enzyme. Une des extrémités de cette fente est fermée par le domaine 3.

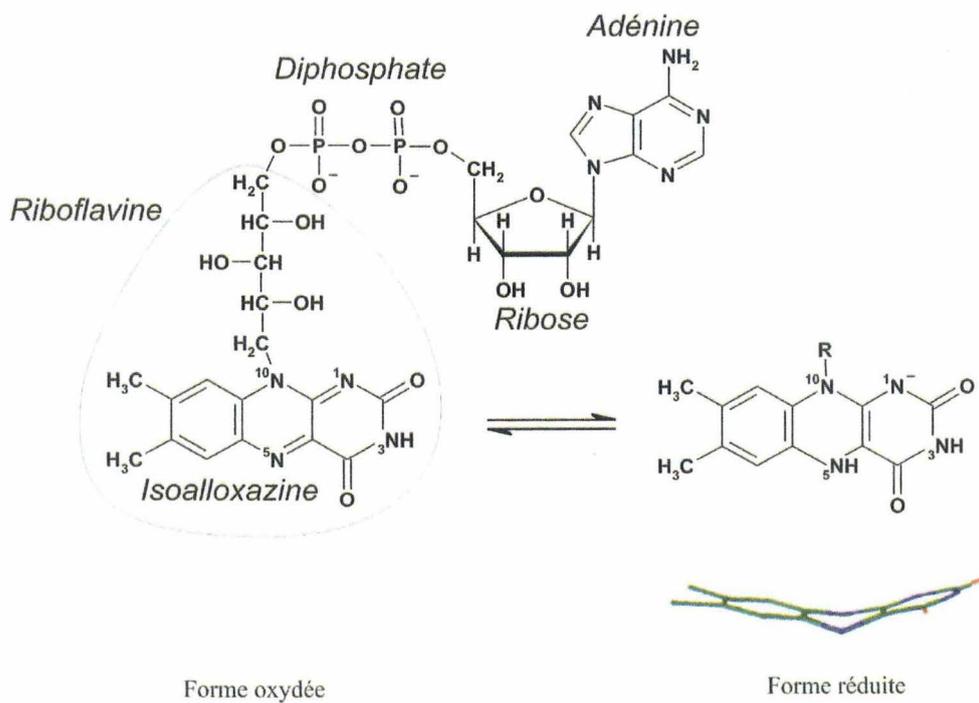


Figure 13. Structure développée du FAD a) sous forme oxydée b) sous forme réduite (S. Godfroid, 2005, mémoire de licence, FUNDP).

Comme deux boucles du domaine 2 bénéficient d'une certaine liberté de mouvement, une hypothèse consiste à dire que ces boucles sont en partie responsables du maintien du substrat dans l'enclave du site actif. En effet, elles sont susceptibles de pouvoir se « contracter » une fois le substrat en place. Remarquons également que la partie du noyau du FAD se trouve dans la cavité du site actif.

L'émergence du phénomène de multi résistance aux antibiotiques de la pharmacopée a conduit à la recherche de molécules spécifiques aux microorganismes pathogènes et à l'étude de nouvelles cibles chimiothérapeutiques potentielles, tel que le galactofuranose (Gal_f) qui participe à la formation de la paroi et donc à la survie de *Mycobacterium tuberculosis*. De ce fait, l'UGM joue un rôle clé dans la biosynthèse de ce composé galactofuranique. C'est pourquoi la caractérisation structurale et la clarification du mécanisme enzymatique de l'UGM est primordiale.

Les hypothèses de mécanisme d'action de l'UGM

Différentes voies réactionnelles décrivant la contraction du cycle galactose ont été proposées :

- a) Formation d'un intermédiaire bicyclo-acétal (Caravano 2003).

Dans le cas de la formation d'un intermédiaire bicyclo-acétal, qui implique le départ du groupe O-UDP . Celui-ci serait ensuite clivé au niveau du carbone anomère et de l' O5 , pour générant ainsi l' UDP-Gal_f . Le FAD sous forme réduite aurait ici un rôle purement conformationnel dans la stabilisation du substrat au sein du site actif.

- b) Réaction avec un résidu du site actif comme nucléophile (Barlow J.N. 2000).

Une deuxième hypothèse prévoit la formation d'un intermédiaire oxycarbénium qui permettrait de libérer l' O-UDP . De nouveau, le cofacteur flavinique ne jouerait qu'un rôle conformationnel.

- c) Réaction avec le FAD comme donneur monoélectronique (Field R.A. 2003).

Le troisième mécanisme réactionnel impliquerait également un passage par un intermédiaire oxycarbénium. Le cofacteur flavinique pourrait alors réduire le carbone anomère.

- d) Réaction avec le FAD comme nucléophile (Soltero-Higgin M. 2004).

La quatrième hypothèse mécanistique est très similaire à la seconde, mais introduit une notion assez neuve : le nucléophile nécessaire à l'ouverture du cycle pyranose ne serait rien d'autre que l'azote N5 du FAD dans sa forme réduite FADH⁻.

L'étude des inhibiteurs et des analogues de substrat de l'UGM mettent donc en évidence la possibilité d'une transition par un oxycarbénium (mécanismes b et c). (Zhang Q. 2001). Ces différentes études montrent qu'il est difficile de favoriser un modèle plutôt qu'un autre. De nombreuses incertitudes persistent donc quant au mécanisme réactionnel de l'UGM.

Ce mémoire vise à éclaircir le mécanisme d'action de cette enzyme. A cette fin, nous avons sélectionné des acides aminés conservés et localisés près du siteactif. Les acides aminés que nous avons choisi sont l'**arginine 278**, l'**histidine 59**, le **glutamate 298** et la **méthionine 349** (Figure 16).

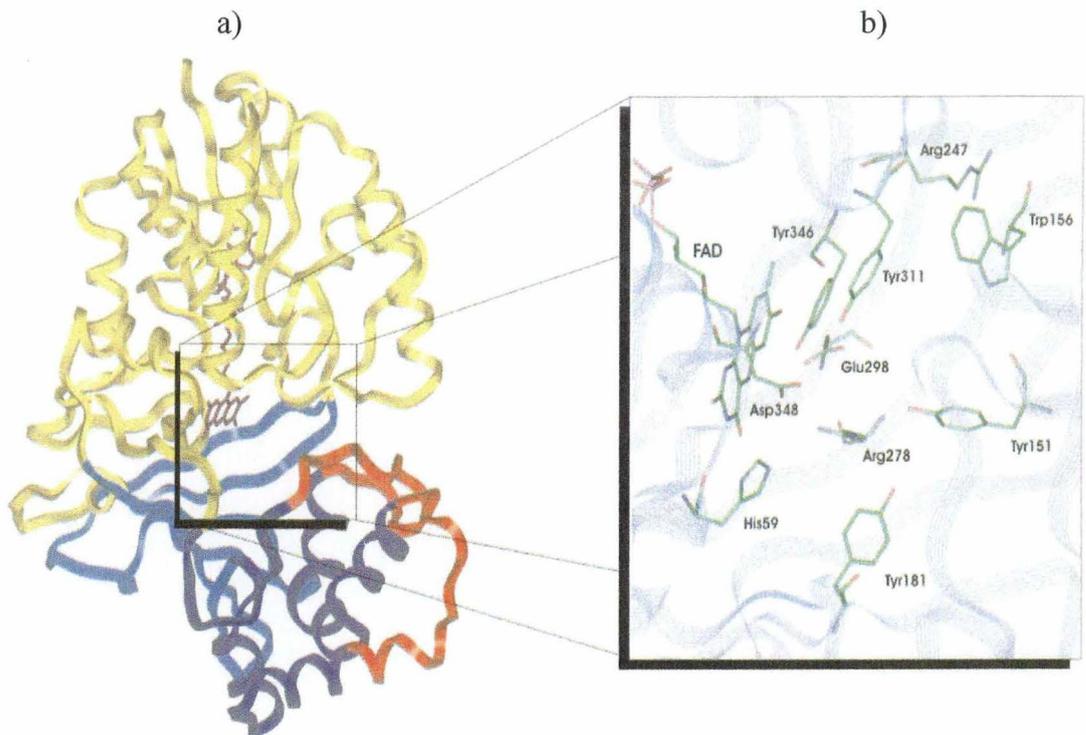


Figure 14. a) Monomère de l'UDP-Galactopyranose mutase : domaine 1 en jaune / domaine 2 en bleu foncé / domaine 3 en bleu clair / boucles en rouge / FAD en violet. b) Résidus bordant le site actif de l'UDP-Galactopyranose mutase (S. Godfroid, 2005, mémoire de licence, FUNDP).

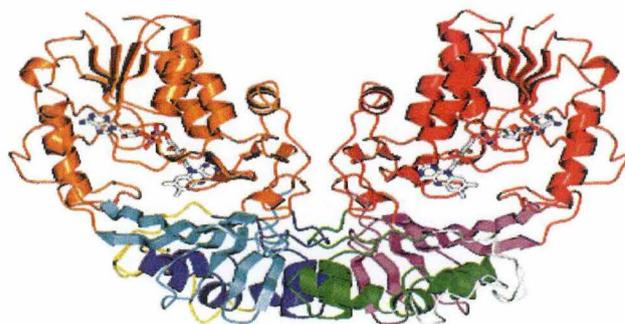


Fig. 15. Structure tridimensionnelle de l'UGM d'*E.coli* déterminée par Sanders et *al.*. Pour le monomère A ; le domaine 1 est en orange, le domaine 2 est bleu et le 3 est cyan. Pour le monomère B ; le domaine 1 est en rouge, le 2 en vert et le 3 en pourpre. Dans chaque monomère on peut voir une molécule de FAD.
(<http://chem4823.usask.ca/~sanders/gallery.htm>).

On choisit ces acides aminés conservés car ils sont susceptibles d'être indispensables au bon fonctionnement de l'enzyme puisqu'ils ont été conservés, malgré la divergence des séquences au cours de l'évolution. On appliquera de la mutagenèse dirigée sur ces acides aminés pour surexprimer les différentes enzymes avec les mutations ponctuelles.

Choix des mutants

Une grande partie en la choix de ces mutants a été basé sur l'étude antérieure réalisée au sein du laboratoire de chimie biologique structurale des FUNDP (S. Godfroid, 2005, mémoire de licence, FUNDP), qui a permis de pointer certains résidus susceptibles de jouer un rôle dans le mécanisme réactionnel de l'UGM.

Il faut expliquer maintenant, le possible rôle que chaque acide amine va jouer pour essayer de comprendre les résultats qu'on aura.

L'**arginine 278** est un résidu flexible qui se trouve au centre du site actif et qui pourrait interagir par pont salin avec le groupement pyrophosphate du substrat. Des travaux de modélisation moléculaire ont montré que cette arginine pouvait adopter deux conformations.

Dans la structure tridimensionnelle de l'UGM d'*E. coli* (Sanders D. A. R. 2001) cristallisée sans ligand, la conformation de l'arginine permet au ligand d'adopter deux modes d'interaction (mode AB et AC), en occupant simultanément deux des trois poches de liaison (A-B-C) définissant le site actif. Lorsque l'UGM est relaxée par mécanique moléculaire, on observe un large mouvement de l'Arg 278 qui est capturée au sein d'un réseau de ponts H avec notamment les Tyr 151 et 311 indispensables à l'activité catalytique (Etude de mutagenèse de Sanders *et al*, 2001) (Figure 18). Ce mouvement bloque alors l'accès à une des trois poches rendant ainsi impossible le mode d'interaction AB (Figure 17).

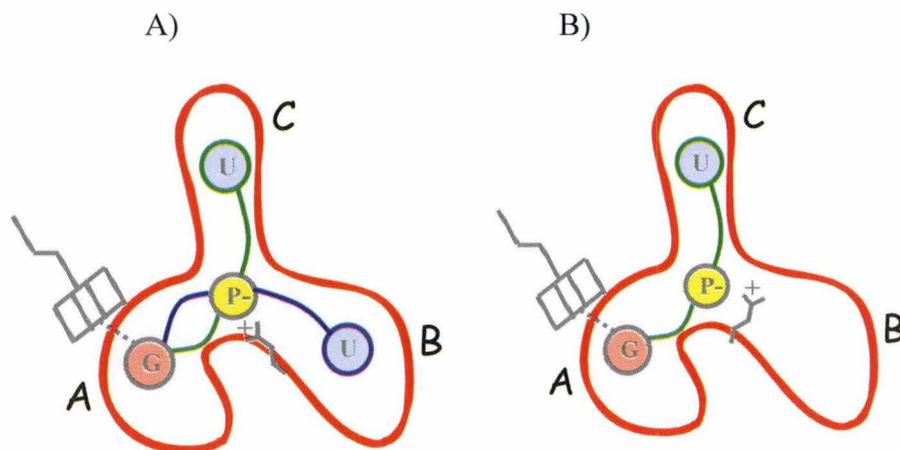
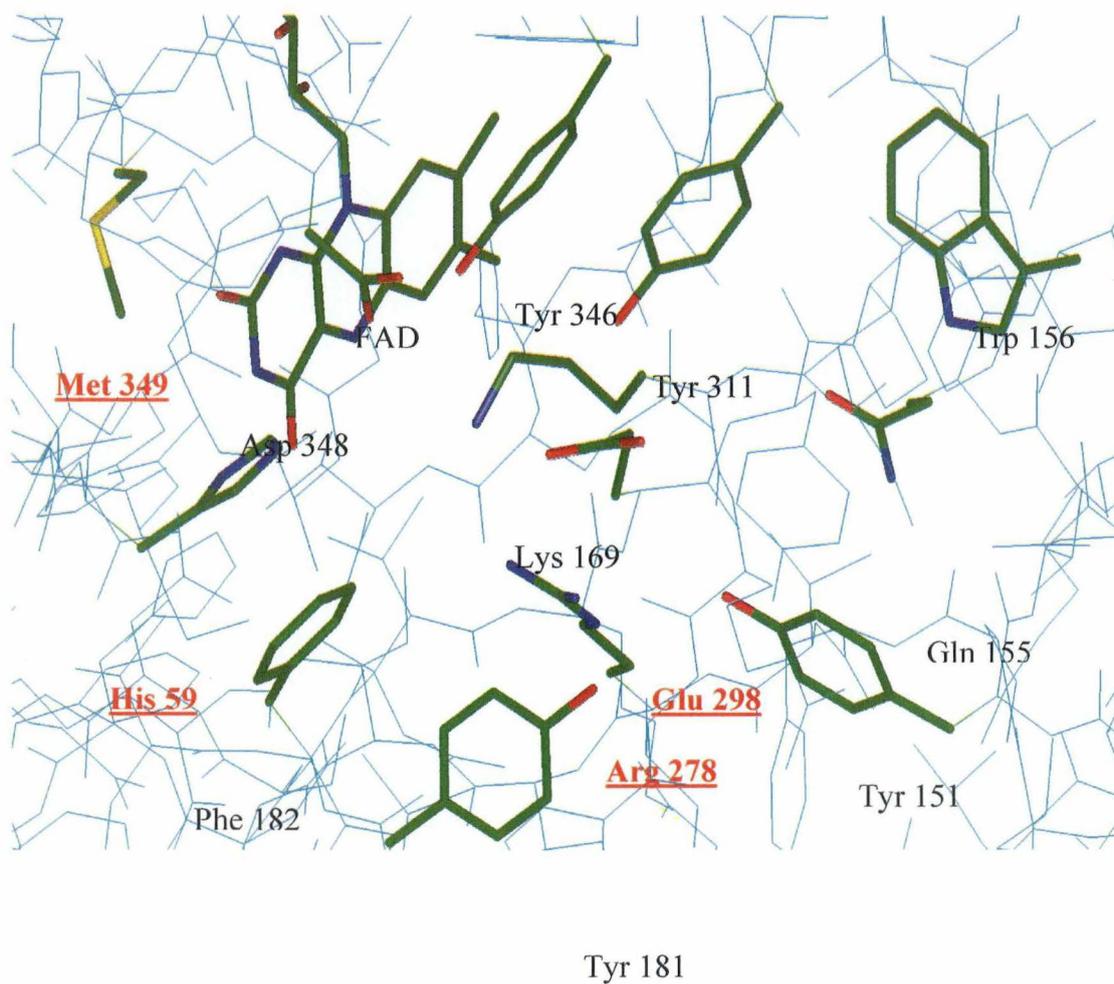


Figure 17 : représentation schématique du mouvement de l'Arg 278 (en gris) suite à la relaxation de l'enzyme. A) Enzyme non relaxée; B) Enzyme après minimisation.

Avec l'aide de la technique de mutagenèse, cette arginine sera substituée par une lysine qui est un acide aminé, aussi chargé positivement mais avec une chaîne latérale différente. Dans d'autres mutants, cette arginine sera remplacée par une leucine ou par une méthionine, qui n'ont pas de charge mais, qui ont aussi une partie hydrophobe dans la chaîne latérale (Figure 18).

Fig. 16. Principaux résidus bordant le site actif de l'UGM. Les acides aminés à muter sont représentés en rouge.(S. Godfroid, 2005, mémoire de licence, FUNDP).



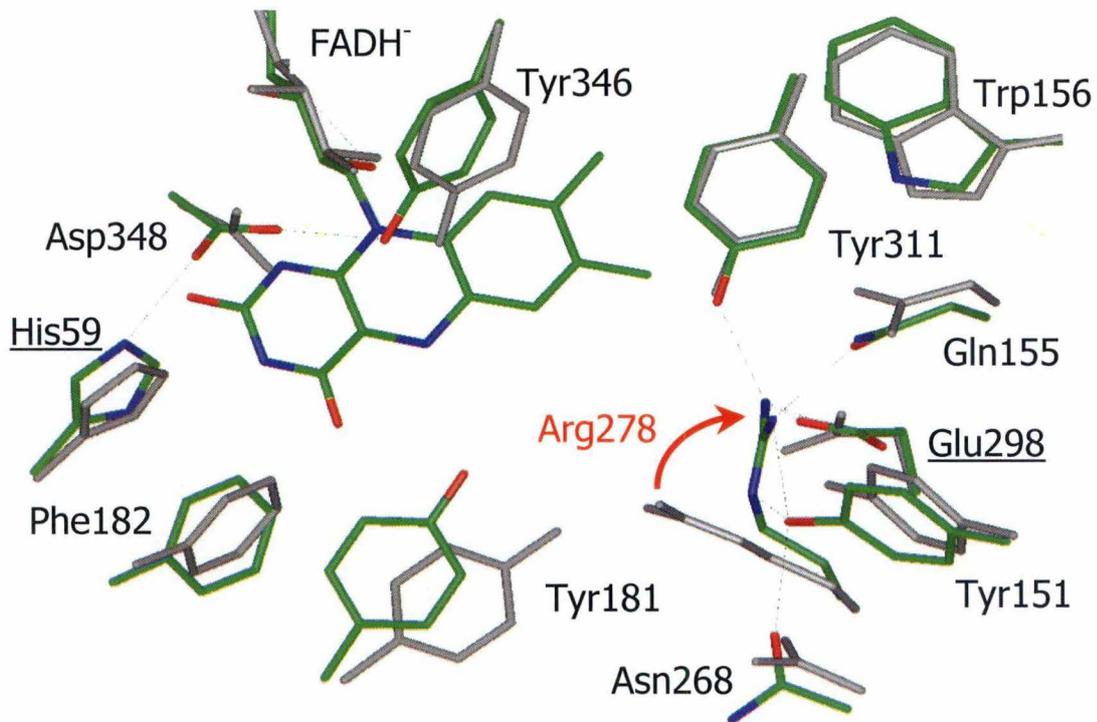


Figure 18 : Changements conformationnels observés lors de la relaxation de l'UGM par mécanique moléculaire. En gris : avant minimisation du site actif, en couleurs par atome : après minimisation.

L'**histidine 59** se trouve à proximité du FAD, dans la poche de liaison du galactose. Ce résidu pourrait servir de base catalytique dans le mécanisme réactionnel de l'UGM. En effet, le cycle imidazole de la chaîne latérale de l'histidine pourrait jouer le rôle d'accepteur de proton. Nous proposons de le remplacer par la phenylalanine, qui a une chaîne latérale cyclique mais ne peut pas jouer le rôle d'une base catalytique, on va le remplacer par une glutamine, qui n'a pas de cycle, mais qui peut former des ponts hydrogènes.

Le **glutamate 298** se trouve près de l'arginine 278 dans le site actif et interagit avec cette arginine lors de la relaxation de l'enzyme. Ce résidu pourrait également jouer le rôle de base catalytique. Nous proposons de le muter en glutamine, afin de perdre ses propriétés acide-base.

La **méthionine 349** est un acide aminé qui ne borde pas vraiment le site actif mais qui est localisé derrière le FAD. Il pourrait interagir avec ce dernier et être impliqué dans sa réactivité, par exemple lors du processus de réduction du noyau isoalloxazine. Nous proposons de le muter en cystéine, en alanine ou en leucine.

OBJECTIF DU TRAVAIL

5. OBJECTIF DU TRAVAIL

Le galactofuranose est un composant essentiel de la paroi de mycobactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis*, et est, de ce fait, indispensable à leur survie. Afin de concevoir de nouvelles molécules anti-bactériennes, il serait intéressant d'empêcher sa formation. Dès lors, l'UDP-galactopyranose mutase, l'enzyme responsable de l'isomérisation de l'UDP-galp en UDP-galf, peut être considérée comme une cible thérapeutique intéressante. Au cours de ce mémoire, nous avons effectué un travail de mutagenèse dirigée, afin de clarifier le mécanisme d'action de cette enzyme.

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'enzyme UDP-Galactopyranose mutase, nous voulons mettre en évidence l'importance de certains acides aminés potentiellement impliqués dans la réaction d'isomérisation et ce par construction de mutants ponctuels.

Pour mener à bien cette tentative, nous utiliserons la technique de mutagenèse dirigée, où la séquence des amorces utilisées pour la réaction de PCR contient la mutation. La séquence ainsi modifiée va coder pour un autre acide aminé que celui présent dans la protéine *wild type*. Ensuite, nous espérons que la surexpression des protéines mutées permettra de mettre en évidence des différences par rapport à la protéine *wild type*.

RESULTATS

1. Choix des mutations

Comme nous l'avons déjà écrit, les différents points de mutation, ont été choisis sur base des travaux effectués précédemment par S. Godfroid en 2005 dans le cadre d'un mémoire de licence effectué sur l'UDP-Galactofuranose mutase (UGM), au laboratoire de chimie biologique structurale (F.U.N.D.P.). Ce travail a permis de proposer un rôle possible de certains acides aminés du centre actif dans le mécanisme de réaction (isomérisation de l'UDP-Galactopyranose). Tous les acides aminés choisis sont conservés, ce qui contribue à de poser l'hypothèse de leur nécessité dans l'activité enzymatique. Le but de ce mémoire est de confirmer cette hypothèse.

Les acides aminés que nous avons choisi de muter sont **l'arginine 278**, **l'histidine 59**, le **glutamate 298** et la **méthionine 349**.

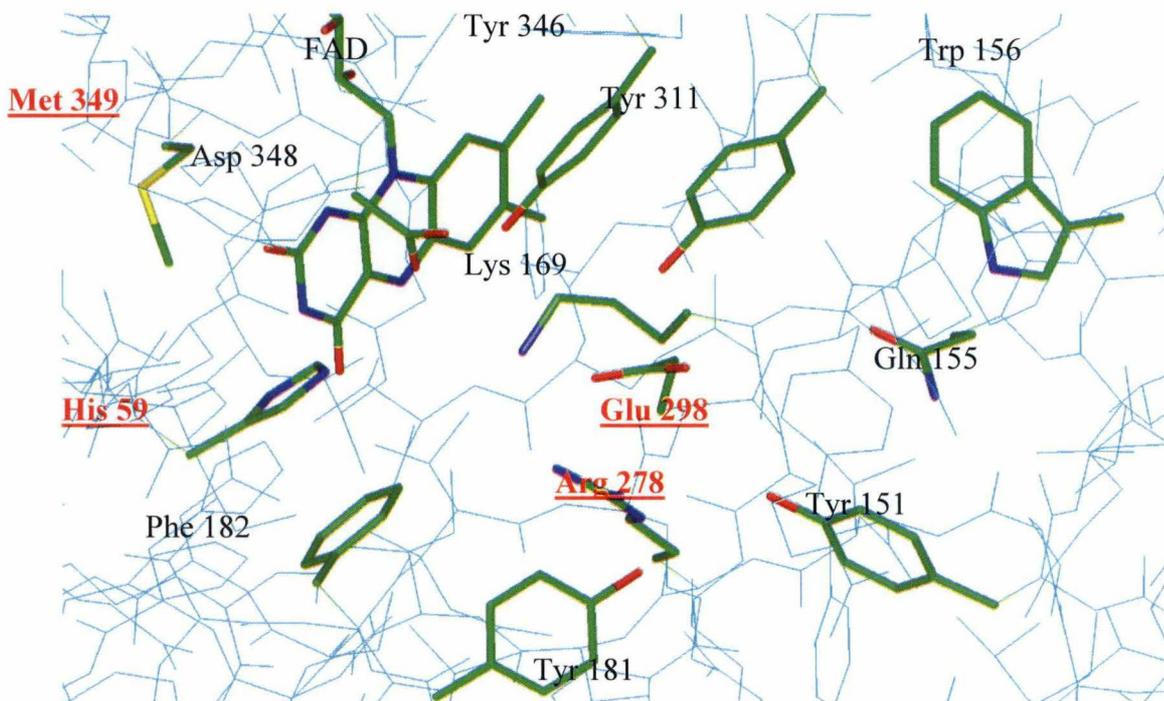


Figure 1. Principaux résidus bordant le site actif de l'UGM. Les acides aminés à muter sont représentés en rouge. (S. Godfroid, 2005, mémoire de licence, FUNDP).

1.1.1. L'arginine 278

De part sa charge positive, l'arginine pourrait interagir avec le groupe phosphate de l'UDP-Galactopyranose. En effet elle pourrait lier le phosphate avec un pont salin qui est une des liaisons qui permet le maintien du substrat dans le site actif. Lorsque l'enzyme est relaxée, on observe que cette arginine est maintenue par un réseau de ponts hydrogènes (ponts H) qui lui permettent d'interagir avec le réseau. L'hypothèse d'un mouvement de cette arginine a été posée. (S. Godfroid, 2005). L'UDP-galactopyranose peut être représentée soit forme de trois groupements, le galactose (G), le phosphate (P-) et l'uracile avec son ribose (U), comme représenté à la figure 2. Au niveau de l'enzyme, il existe trois poches de liaison (A, B et C). L'Arg278 est située à l'intersection entre ces trois poches, et permet deux modes de fixation du substrat, AB et AC. Au cours d'une

minimisation d'énergie (relaxation), on observe un mouvement de l'Arg278, qui après relaxation ne permet plus que la fixation selon un mode AC.

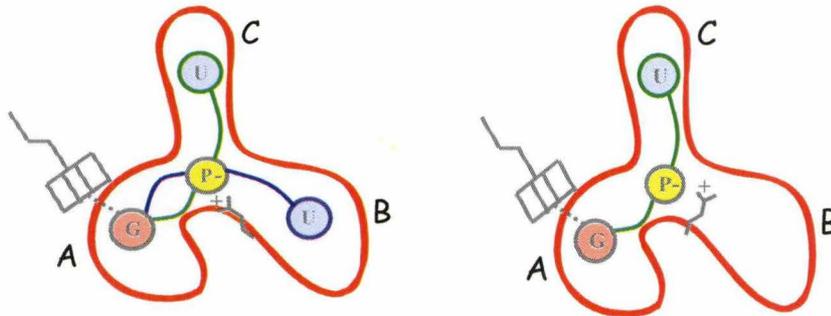


Figure 2. Représentation schématique du mouvement de l'Arg 278 (en gris) suite à la relaxation de l'enzyme. A) Enzyme non relaxée; B) Enzyme après minimisation (S. Godfroid, 2005, mémoire de licence, FUNDP).

Grâce à la mutagenèse dirigée, l'arginine 278 (R278) a été remplacée par différents acides aminés :

- Une **lysine** (mutation R278K) qui est assez proche d'une arginine. Comme l'arginine (fig. 3a), la chaîne latérale de la lysine est chargée positivement (fig. 3b) à pH physiologique ce qui devrait permettre de conserver l'interaction avec le groupement pyrophosphate du substrat. Par contre, le réseau de ponts H avec les tyrosines 311 et 151 devrait être perturbé par cette mutation. Dans ce cas, l'accès à la poche B pourrait être maintenu.
- Une **leucine** et une **méthionine** (mutations: R278L et R278M, respectivement). Ces a.a. sont des résidus stériquement assez proches de l'arginine (fig. 3c et d). Par contre ici, on supprime toute possibilité d'interaction de type pont H ou pont salin.

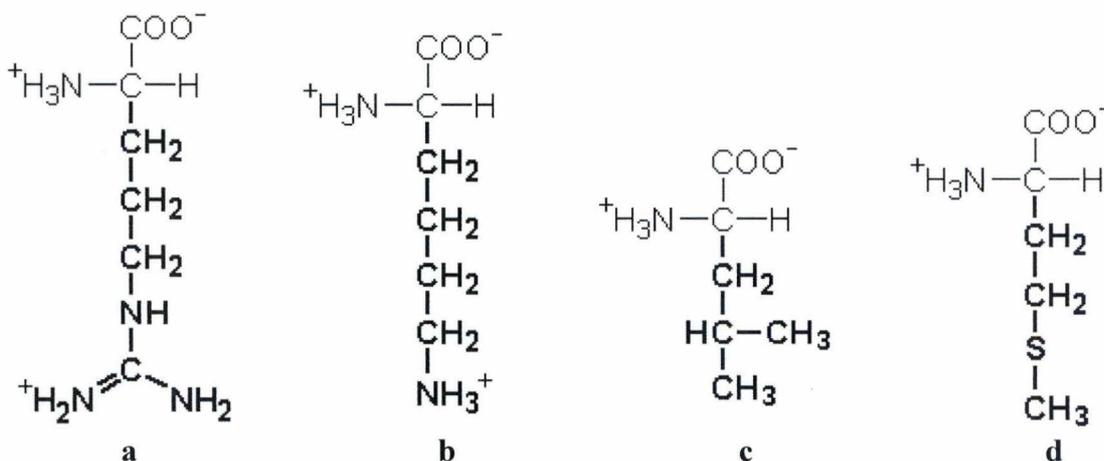


Figure 3. Structures des acides aminés utilisés lors de la mutagenèse dirigée. a : l'arginine, b : la lysine, c : la leucine, d : la methionine. (<http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects>).

1.1.2. L'histidine 59

Cette histidine est à proximité du FAD, cofacteur de l'UGM et dans le site de liaison du galactose. De part la présence d'un cycle imidazole dans la chaîne latérale de l'histidine (fig. 4a) nous pensons que cette dernière pourrait jouer le rôle d'accepteur de protons. Afin de vérifier cette hypothèse, l'histidine 59 (H59) a été remplacée par :

- Une **phenylalanine** (mutation H59F). Il s'agit d'un acide aminé qui conserve les propriétés aromatiques de l'histidine (fig. 4b), mais qui ne peut cependant pas intervenir dans les réactions acide-base en tant que donneur de proton.
- Une **glutamine** (mutation H59Q). Cet a. a. est stériquement proche de l'histidine (fig. 4c) bien qu'il ne puisse jouer le rôle d'accepteur de proton.

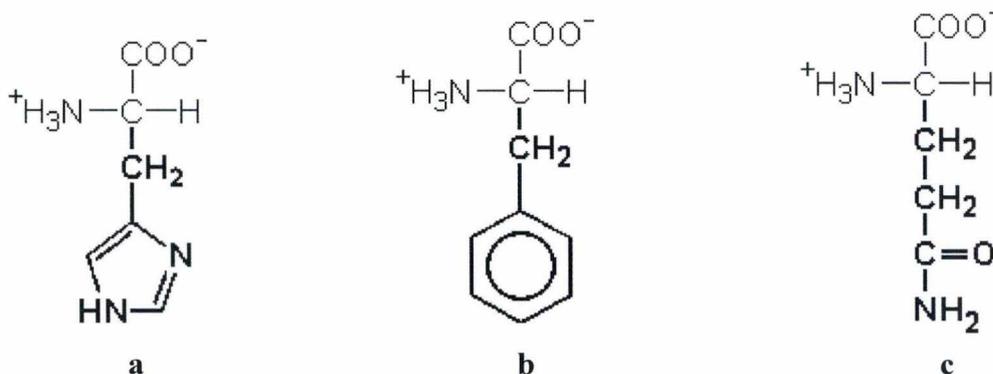


Figure 4. Structure de l'histidine (a), de la phénylalanine (b) et de la glutamine (c). (<http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects>).

1.1.3. Le glutamate 298

Ce glutamate se trouve dans le site actif de l'enzyme et peut interagir avec l'arginine 278 lors de la relaxation de l'enzyme. De part sa position dans le site actif, ce résidu pourrait jouer le rôle de base catalytique ; c'est pourquoi nous avons muté cet acide aminé en **glutamine** (mutation E298Q) qui comme nous l'avons déjà dit, ne peut pas jouer d'accepteur de protons (Figure 5).

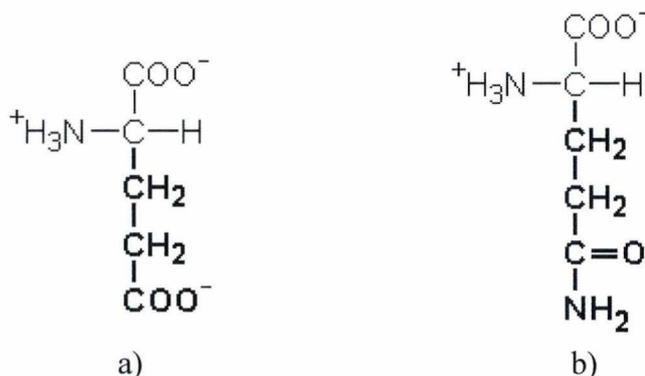


Figure 5. Structure du glutamate (a) et de la glutamine (b). (<http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects>).

1.1.3. La méthionine 349

Cette méthionine ne se situe pas à l'intérieur du site actif mais, de par sa localisation, elle pourrait interagir avec le FAD. Cette interaction pourrait être impliquée dans le processus de réduction du noyau isoalloxazine. C'est pourquoi nous avons muté la méthionine 349 en (i) **cystéine** (mutation M349C), (ii) **alanine** (mutation M349A), (iii) **leucine** (mutation M349L). Tous ces acides aminés possèdent des structures et des charges très différentes de la méthionine (Figure 6). La cystéine conserve un atome de soufre, mais la taille et l'hydrophobicité sont différentes. L'alanine est de taille très réduite et la leucine présente une taille similaire et une hydrophobicité comparable.

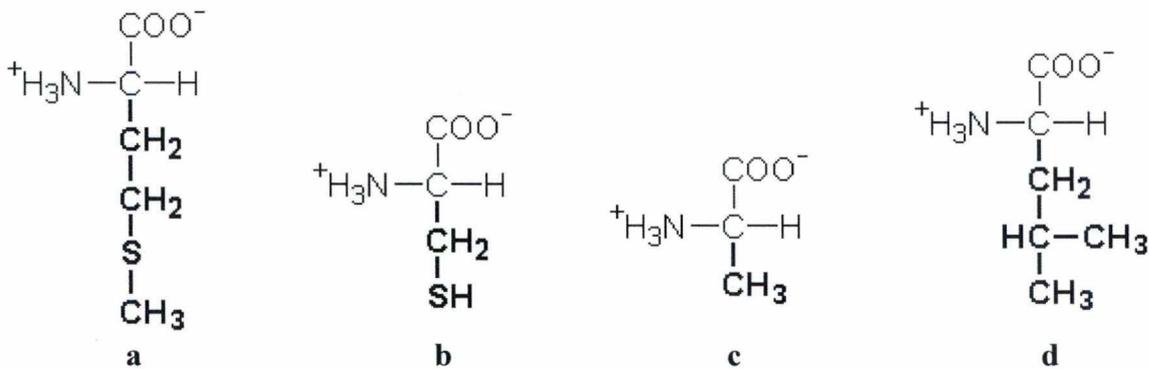


Figure 6. Structure de la méthionine (a), et des acides aminés l'ayant substituée : la cystéine (b), l'alanine (c) et la leucine (d). (<http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects>).

2. Stratégie

Afin d'effectuer les changements d'acides aminés décrits ci-dessus, la séquence d'ADN codant pour l'UDP-Galactopyranose mutase (*glf*) a été modifiée par mutagenèse dirigée. Pour cela, nous avons utilisé le plasmide pMLD200, portant le gène d'intérêt (*glf*). Ce plasmide nous permet de travailler avec *E. coli* et d'éviter ainsi la manipulation de *Mycobacterium tuberculosis*, beaucoup plus contraignant notamment de par sa pathogénicité. Le pMLD200 (6511pb) a été construit à partir de deux plasmides : le pET21d et le pQE60, et permet la surexpression de *glf* sous la dépendance du promoteur T7.

Préparation du plasmide pMLD200

Le plasmide pMLD200 a été introduit par transformation dans une souche d' *E. coli* DH10B afin d'en purifier une grande quantité. Les bactéries ayant acquis le plasmide ont été sélectionnées sur un milieu contenant de l'ampicilline.

Une fois purifié à partir de ces bactéries, le plasmide pMLD200 a été contrôlé par restriction enzymatique avec les enzymes *Xba*I et *Bgl*II dont les sites de restriction sont situés de part et d'autre du gène *glf* (figure 7). La taille des fragments obtenus est en accord avec le profil attendu (1104 bp et 5407 bp).

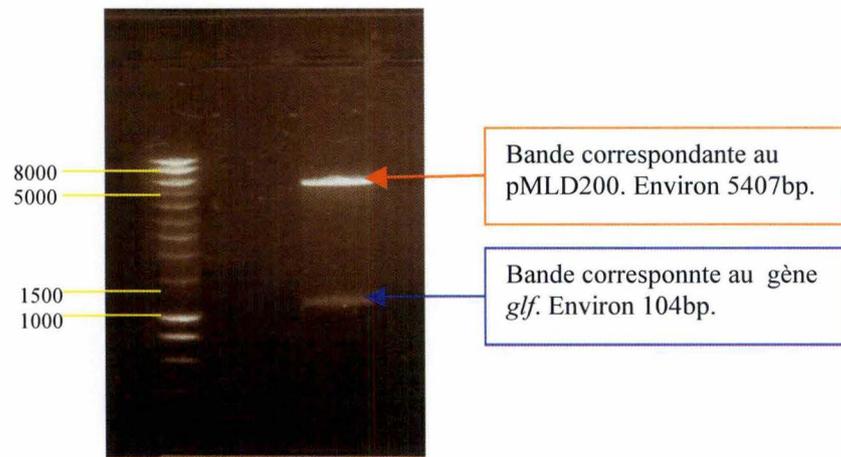


Figure 8. Gel d'agarose qui montre deux bandes correspondantes aux deux fragments dans lesquels le pMLD200 va se couper avec *Xba* I et *Bgl* II. Comme la taille de pMLD200 est de 6511bp et le gène *glf* a une taille de 1104bp, on attendre une bande à 1104bp comme le gène et une d'autre à 5407bp. Avec le marqueur de poids moléculaire (les tailles indiquées sont en paires de base).

Mutagenèse du gène *glf*

Les mutations dans le gène *glf* ont été réalisées en sept étapes, illustrées figure 8.

- 1) Le pMLD200 a été restreint par *Xba*I et *Bgl*III, libérant ainsi le gène *glf*.
- 2) Une première PCR (PCR 1) visant à amplifier la partie amont de *glf* a été réalisée à l'aide de deux primers. La séquence de l'un de ces primers porte la mutation à introduire dans la séquence de *glf*.
- 3) Une deuxième PCR (PCR 2) visant à amplifier la partie aval de *glf* a été réalisée à l'aide de deux primers. La séquence de l'un de ces primers porte la mutation à introduire dans la séquence de *glf*.
- 4) Les deux primers portant la mutation sont complémentaires. Donc les extrémités des produits PCR 1 et 2 sont compatibles. Après dénaturation et hybridation, les extrémités des produits PCR 1 et 2 pourront s'hybrider pour donner deux extrémités 3' hybridées, points de départ de polymérisations qui permettront l'obtention d'une troisième produit PCR (PCR 3).
- 5) Le produit PCR 3 ainsi obtenu et correspondant à l'entièreté du gène *glf* muté à été cloné dans le vecteur pGEMT-easy.
- 6) et 7) Les plasmides recombinants (pGEM-T easy + *glf* muté) ont été restreints par *Xba*I et *Bgl*III afin d'insérer le gène *glf* muté dans le pMLD200.

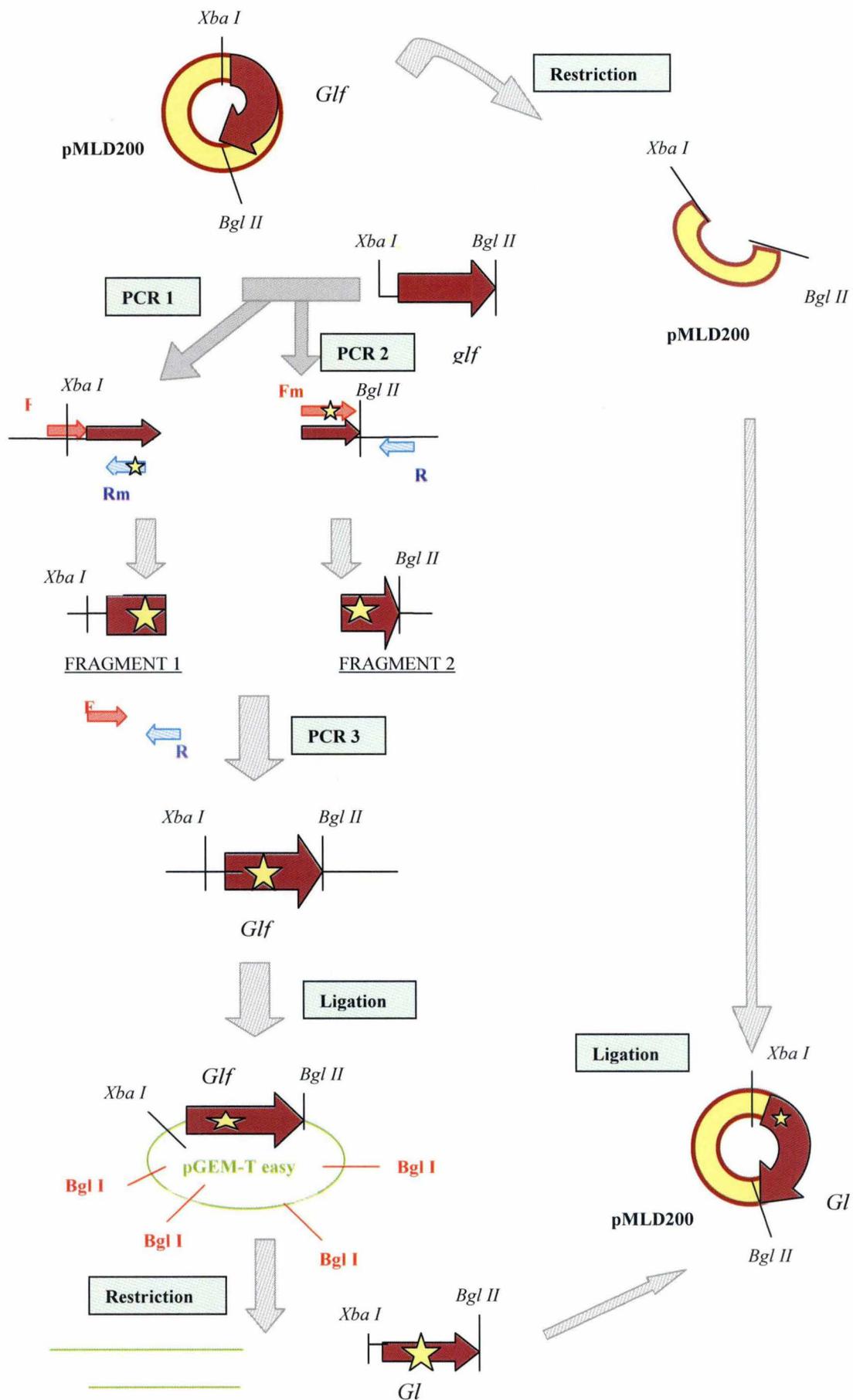


Figure 8. Schéma de la stratégie que nous avons suivie pour la construction des mutants ponctuels de l'UGM.

2.1.1. Choix de la séquence des primers pour les PCR 1 et 2

La « Polymerase Chain reaction » (PCR) nécessite la synthèse préalable d'amorces oligonucléotidiques, ou primers. La séquence des primers est déterminée de façon à ce que ces derniers s'hybrident de façon complémentaire à la séquence à amplifier.

La PCR 1 est réalisée avec le primer F d'une part, permettant l'insertion du site *Xba*I en amont du gène *glf*, et avec un primer Rm portant la mutation à introduire d'autre part (figure 9).

La PCR2 est réalisée avec le primer Fm, portant la mutation à introduire d'une part, et le primer R d'autre part.

Les deux types de primers utilisés sont présentés à la figure 9.

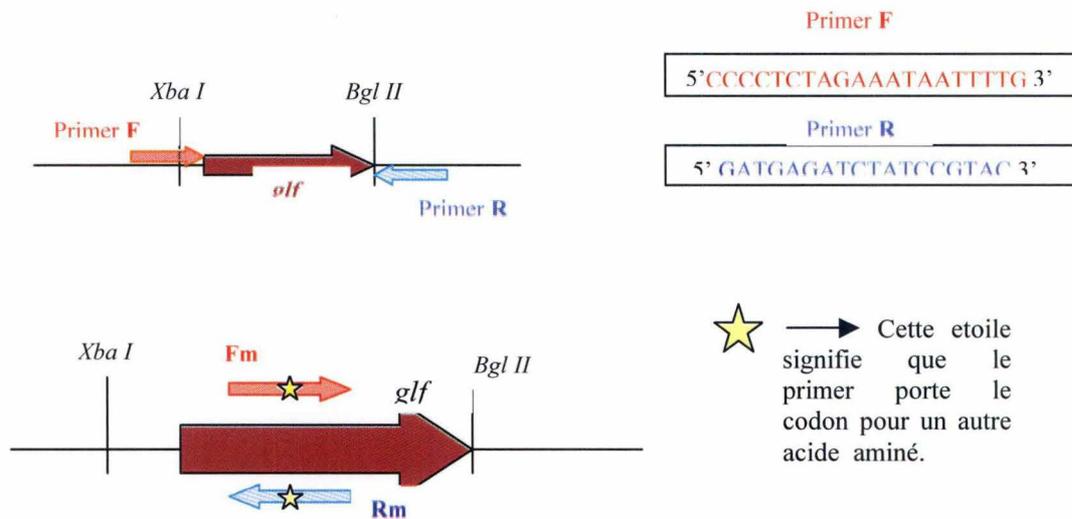


Figure 9. Représentation des différents types de primers utilisés lors de la mutagenèse.

Les séquences des différents primers Rm et Fm portent un codon permettant d'engendrer les mutations voulues (Table 1). Ces codons « mutés » ont été positionnés au centre de la séquence des primers ce qui devrait limiter les problèmes d'hybridation dus à ces mutations.

Mutation	Primer Fm	Primer Rm
R278K. Arginine → lysine	5' gTACCATATACCAAAATAATTg 3'	5' gCTCAATTATTTTggTATATg 3'
R278L. Arginine → leucine	5' gTACCATATACCTAATAATTg 3'	5' gCTCAATTATTAgggTATATg 3'
R278M. Arginine → méthionine	5' gTACCATATACCATgATAATTg 3'	5' gCTCAATTATCATggTATATg 3'
H59F. Histidine → phenylalanine	5' gCACATATTTTTTTCACCAATg 3'	5' CATTggTgAAAAAATATgTgC 3'
H59Q. Histidine → glutamine	5' gCACATATTTTTCAAACCAATg 3'	5' CATTggTTTgAAAAATATgTgC 3'
E298Q. Glutamate → glutamine	5' gTTACAAAACAgTATCCATTg 3'	5' CTAATggATACTgTTTTgTAAC 3'
M349C. Méthionine → cystéine	5' TATTATgATTgCCATCAAgTg 3'	5' TTgATggCAATCATAATATTTATAC 3'
M349A. Méthionine → alanine	5' TATTATgATgCgCATCAAgTg 3'	5' TTgATgCgCATCATAATATTTATAC 3'
M349L. Méthionine → leucine	5' TATTATgATCTgCATCAAgTg 3'	5' TTgATgCAgATCATAATATTTATAC 3'

Table 1. Séquence des primers Fm et Rm permettant l'insertion des mutations visées sur le gène *glf*.

Les mutations engendrées par ces PCR sont présentées dans la table 2.

Mutation	Séquence sauvage	Séquence mutée
R278K. Arginine → lysine	CTAATGTACCATATACCAGAAATAATTGAGCA TAA	CTAATGTACCATATACC AA AATAATTGAGCATAA
R278L. Arginine → leucine	CTAATGTACCATATACCAGAAATAATTGAGCA TAA	CTAATGTACCATATACC CTA AATAATTGAGCATAA
R278M. Arginine → méthionine	CTAATGTACCATATACCAGAAATAATTGAGCA TAA	CTAATGTACCATATACC ATG AATAATTGAGCATAA
H59F. Histidine → phenylalanine	ATGGTGCACATATTTTCATACCAATGATAA ATA	ATGGTGCACATATTTTTC ACCA ATGATAAATA
H59Q. Histidine → glutamine	ATGGTGCACATATTTTCATACCAATGATAA ATA	ATGGTGCACATATTTTTC AA ACCAATGATAAATA
E298Q. Glutamate → glutamine	GCATACGGTTGTACAAAAGAAATATCCATTA GAG	GCATACGGTTGTACAAAAC AGT ATCCATTAGAG
M349C. Méthionine → cystéine	GTATAAATATTATGATATGCATCAAGTGATAT CT	GTATAAATATTATGAT TGC CATCAAGTGATATC
M349A. Méthionine → alanine	GTATAAATATTATGATATGCATCAAGTGATAT CT	GTATAAATATTATGAT TGC CATCAAGTGATATC
M349L. Méthionine → leucine	GTATAAATATTATGATATGCATCAAGTGATAT CT	GTATAAATATTATGAT CTG CATCAAGTGATATC

Table 2. Comparaison de la séquence du gène glf avant et après mutagenèse.

2.1.2. Réalisation de la mutagenèse (PCR 1 et 2)

Comme décrit plus haut, pour chaque mutation les couples de primers F/Rm et R/Fm, vont permettre l'amplification des deux parties du gène (figure 10).

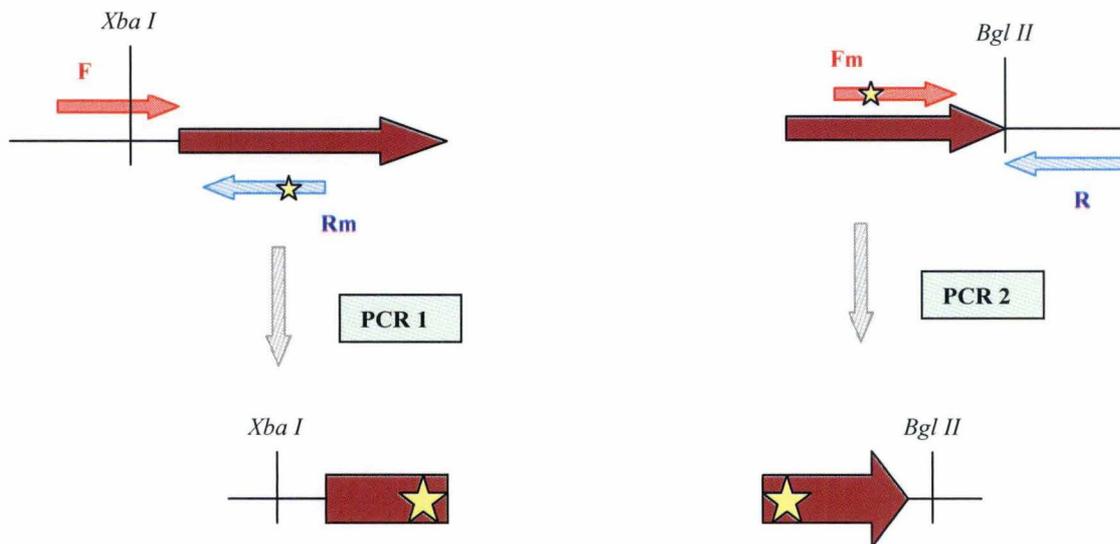


Figure 10. Schéma des PCR 1 et 2. Représentation des deux PCR (1 et 2), qui permettent l'obtention de produits qui présentent une séquence identique à proximité du codon muté.

La taille des produits PCR a été contrôlée à chaque étape. Selon la zone du gène où se situe la mutation, nous obtiendrons des produits de différentes tailles. La taille des amplicons attendus est présentée dans la Table 3. Les photos des électrophorèses visant à déterminer la taille de ces produits sont présentées à la figure 11.

Mutation	Taille fragments avec les primers F et Rm (PCR 1)	Taille fragments avec les primers R et Fm (PCR2)
R278K. Arginine → lysine	834bp 	270bp 
R278L. Arginine → leucine	834bp 	270bp 
R278M. Arginine → méthionine	834bp 	270bp 
H59F. Histidine → phenylalanine	177bp 	927bp 
H59Q. Histidine → glutamine	177bp 	927bp 
E298Q. Glutamate → glutamine	894bp 	210bp 
M349C. Méthionine → cystéine	1047bp 	57bp 
M349A. Méthionine → alanine	1047bp 	57bp 
M349L. Méthionine → leucine	1047bp 	57bp 

Tableau 3. Différentes PCR 1 pour chaque mutation avec la combinaison des primers. La somme de tailles des amplicons PCR 1 et PCR 2 doit donner 1104 bp, la taille du gène *glf*.

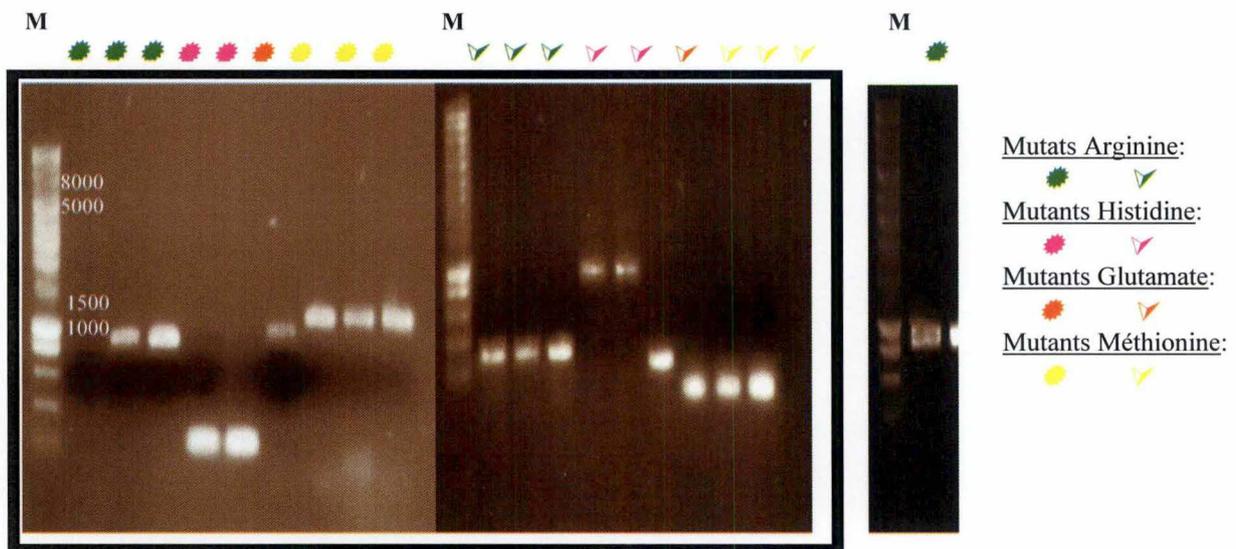


Figure 13. PCR1.

Figure 14. PCR2.

Figure 15.

Figure 11. Tous les mutants résultant de la PCR 1 (avec les primers F et Rm), sauf la première qui n'a pas fonctionné. La **Figure 15** est la répétition de la piste 1 de la PCR 1. La **Figure 14** est la PCR 2 (primers R et Fm).

Nous avons donc obtenu les fragments PCR nécessaires à la réalisation de neuf mutations visées.

2.1.3. Union des deux fragments mutés du gène *glf* (PCR 3)

Une fois les deux produits (PCR 1 et 2) de la taille attendue obtenus, ces derniers ont été utilisés comme matrice lors de troisièmes PCR afin de reconstituer les alleles du gène *glf* portant les différentes mutations (Figure 12). Les primers F et R ont été utilisés à cette fin.

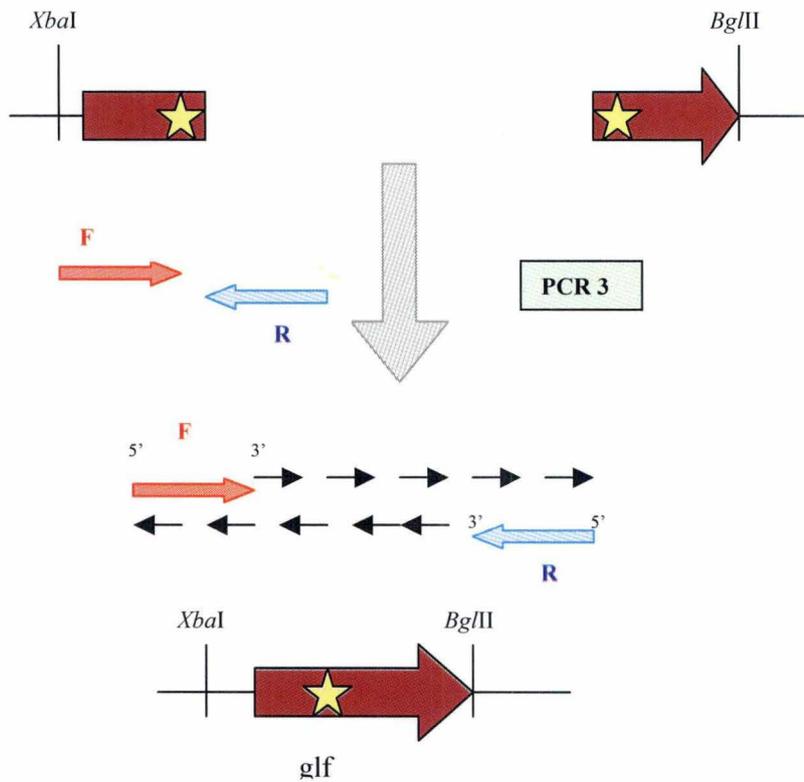


Figure 12. Schéma du principe des PCR3. Les deux fragments du gène *glf* sont réunis par PCR en utilisant les primers F et R, avec les PCR 1 et 2 complémentaires comme matrice.

Les produits PCR 3 ont été contrôlés par électrophorèse en gel d'agarose. La taille des amplicons attendus est de 1104 pb (taille du gène *glf*). Ces résultats sont présentés figure 13.

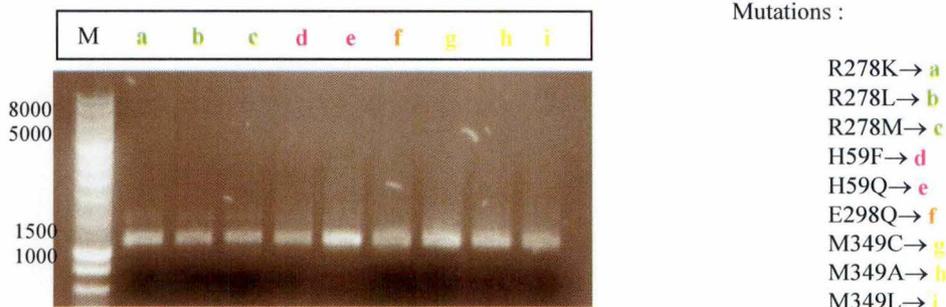


Figure 13. Détermination de la taille des amplicons PCR 3 par électrophorèse en gel d'agarose. Chaque couleur en haut des pistes correspond à une mutation. Le code couleur est le même que celui utilisé table 3.

Les PCR 3 correspondant à chacun des neuf allèles mutés du gène *glf* ont les tailles attendues et seront séquencés afin de contrôler la présence des mutations souhaitées.

2.1.4. Séquençage des fragments PCR 3

Afin de séquencer les neuf allèles mutés obtenus, les PCR 3 ont été clonées dans le plasmide pGEM-T easy (figure 14).

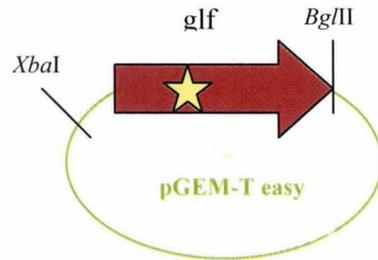
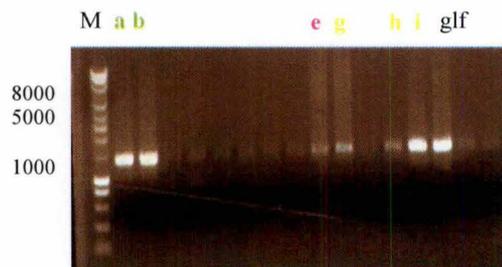


Figure 14. Clonage des allèles mutés *glf* dans le plasmide pGEM-T easy.

Les produits de ligation ont servi à transformer des *E. coli* DH10B. Les clones recombinants ont été sélectionnés sur LB additionné d'ampicilline, d'X-gal et d'IPTG grâce au test blanc/bleu (α -complémentation). Les clones ayant incorporé un plasmide recombinant (insertion de l'allèle muté dans le pGEM-T) sont de couleur blanche alors que les clones bleus correspondent aux bactéries ayant incorporé un vecteur sans insert (principe du test blanc/bleu : voir le matériel et méthodes).

Les plasmides recombinants résultants ont été contrôlés par PCR diagnostique, effectuées avec les primers universels pGEM-T amont et aval s'hybridant de part et d'autre du site de clonage du pGEM-T. La taille des produits PCR attendus est de 1104 pb (Figure 15).



Figures 15. Les six mutations qui ont donné le bon profil. Piste a : mutation R278K, piste b : mutation R278L, piste e : mutation H59Q, piste g : mutation M349C, piste h : mutation M349A, piste i : mutation M349L et piste 7 : *glf* avec restriction *Xba* I-*Bgl* II sans la mutation pour comparaison des tailles.

Seuls six des neufs allèles mutants construits avaient la taille attendue. Les six pGEM-T easy portant ces allèles ont été linéarisés par *Bgl*II afin d'estimer leur concentration, étape indispensable au séquençage. L'estimation de la concentration a été réalisée par l'examen de l'intensité de fluorescence des bandes marquées au bromure d'éthidium après migration dans un gel d'agarose, par rapport à l'intensité de bandes contrôles.

Les séquences obtenues ont été alignées à la séquence sauvage de *glf* afin de contrôler la présence de la mutation souhaitée, et l'absence de mutation indésirable.

Les allèles mutés envoyés au séquençage sont ceux qui portent les mutations suivantes :

- **R278K**, mutation de l'arginine 278 en lysine.
- **R278L**, mutation de l'arginine 278 en leucine.
- **H59Q**, mutation de l'histidine 59 en glutamine.
- **M349C**, mutation de la méthionine 349 en cystéine.
- **M349A**, mutation de la méthionine 349 en alanine.

- **M349L**, mutation de la méthionine 349 en leucine.

De ces six échantillons, seul l'allèle portant la mutation **R278L** n'est pas correct et par conséquent nous devrons l'exclure de la suite des manipulations.

2.1.5. II.2.4. Ligation des allèles mutés dans le vecteur de surexpression pMLD200

Les cinq allèles mutés obtenus ont été excisés du pGEM-T easy grâce à une restriction avec les enzymes *XbaI*, *BglII* et *BglI* (figure 16). Les enzymes *XbaI* et *BglII* permettent de récupérer le fragment d'intérêt, tandis que l'enzyme *BglI*, de part ses nombreux sites présent sur le pGEM-T permet de découper ce vecteur.

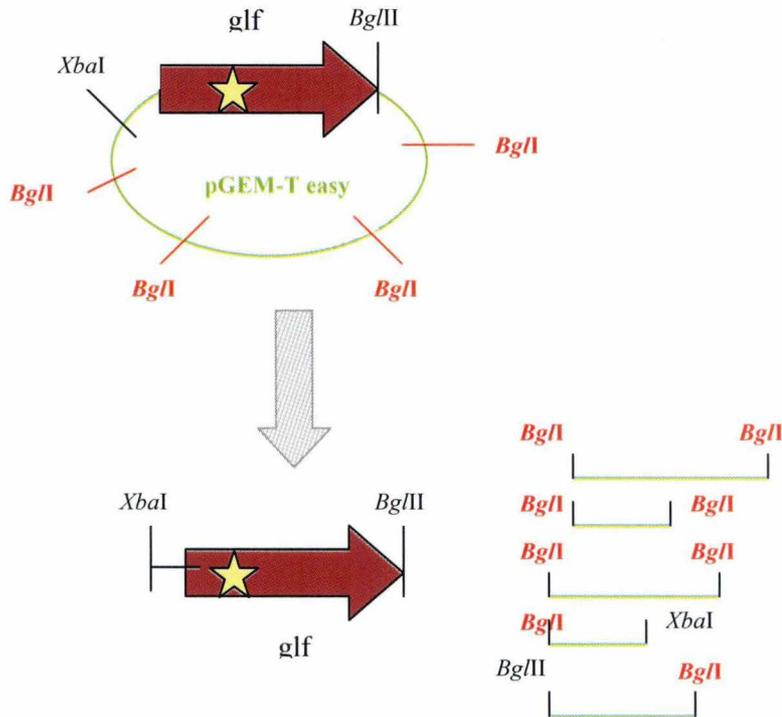


Figure 16. Illustration de la triple restriction enzymatique *XbaI*-*BglII*-*BglI* des pGEM-T easy recombinants.

Les fragments d'intérêt ainsi obtenus ont été clonés dans le vecteur pMLD200 restreint par les mêmes enzymes. Le vecteur restreint ainsi que les inserts ont été quantifiés sur gel d'agarose afin de les mélanger en quantité adéquate lors de la ligation (trois fois plus d'insert que de vecteur de destination). Les produits de ligation ont été utilisés afin de transformer des *E. coli* DH10B (figure 17). Les clones recombinants ont été sélectionnés sur milieu LB additionné d'ampicilline.

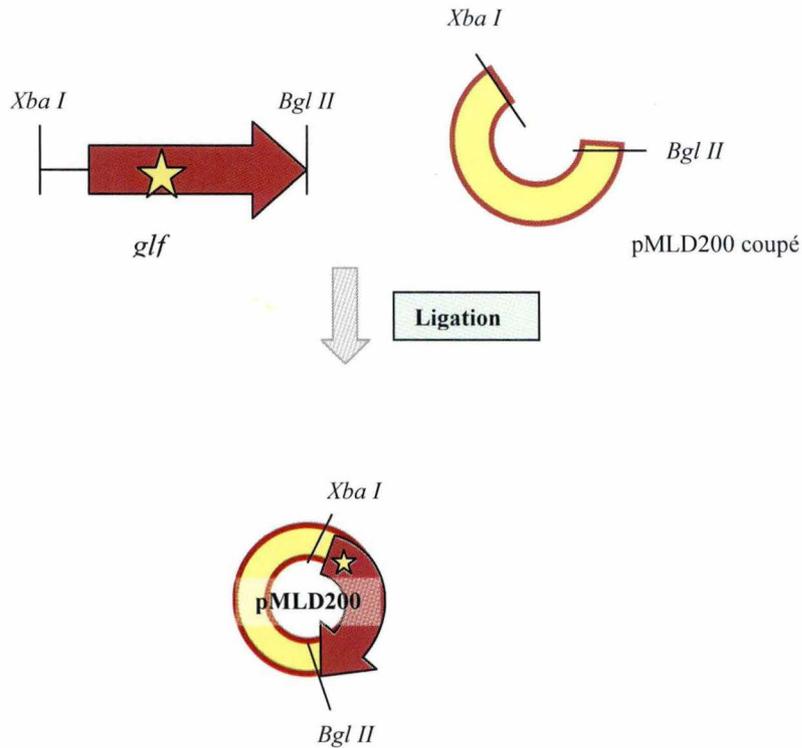
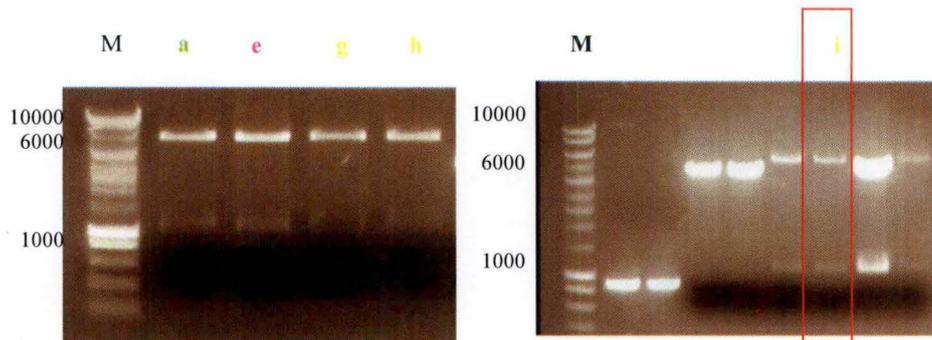


Figure 17. Schéma de la ligation des allèles mutés de *glf* dans le vecteur de surexpression pMLD200.

Les plasmides recombinants ont été purifiés puis testés par restrictions diagnostiques avec les enzymes *Xba*I et *Bgl*II. Ces produits de restriction ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose (Figure 18). La taille des bandes attendues est de 5407 pb et de 1104 pb (correspond au gène *glf*). La présence du gène dans le vecteur est ainsi contrôlée.



Figures 18. Piste a : mutation R278K, piste e : mutation H59Q, piste g : mutation M349C, piste h : mutation M349A et piste en rouge de deuxième gel, mutation M349L.

Nous avons observé que les vecteurs de surexpression contenant les cinq allèles mutés présentent bien le profil de restriction attendu. Ces plasmides ont été introduits dans la souche de surexpression *E. coli* BL21 pRiL (souche avec le plasmide pRiL qui permet de contrer certains biais) en vue de la purification des protéines mutées d'intérêt. La sélection des bactéries recombinantes a été réalisée sur LB additionné d'ampicilline et de chloramphénicol (résistance encodée par le plasmide pRiL). Afin de vérifier que les clones sélectionnés possèdent les gènes de l'UGM mutés, une restriction enzymatique *Xba*I-*Bgl*II a été réalisée sur les plasmides pMLD200 recombinants purifiés. Le résultat de ces restrictions diagnostiques est présenté figure 19.

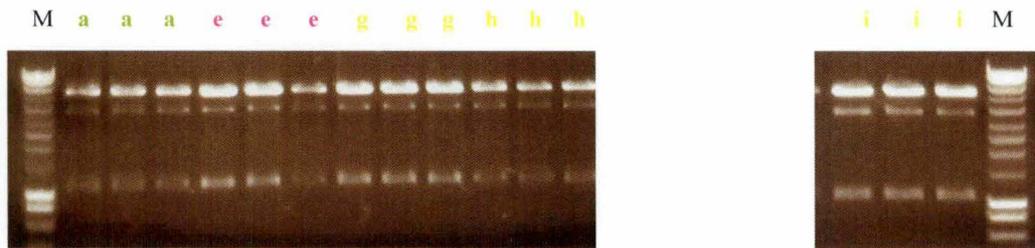


Figure 19. 3 clones pour chaque mutation ont été coupés par *Xba* I et *Bgl* II. On observe une bande à 5407 bp qui correspond à pMLD200, une d'autre à 1104 bp qui correspond à *glf* et une troisième à 4000 bp qui correspond au plasmide pRiL.

Nous avons donc obtenu les cinq souches recombinantes *E. coli* BL21 contenant les vecteurs recombinants permettant la surexpression des cinq UGM mutées.

3. Surexpression des l'UDP-Galactofuranose mutase mutées dans *E. coli* BL21

Surexpression de protéines recombinantes

III.1.1. Principe :

Nous avons réalisé la surexpression des UGM mutées grâce à la souche génétiquement modifiée d'*E. coli* (BL21(DE3) pRiL, Novagen). Celle-ci a été transformée avec chacun des cinq plasmides pMLD200 codant pour les UDP-Galactofuranose mutase mutées et tagguées His₆ (Figure 20).

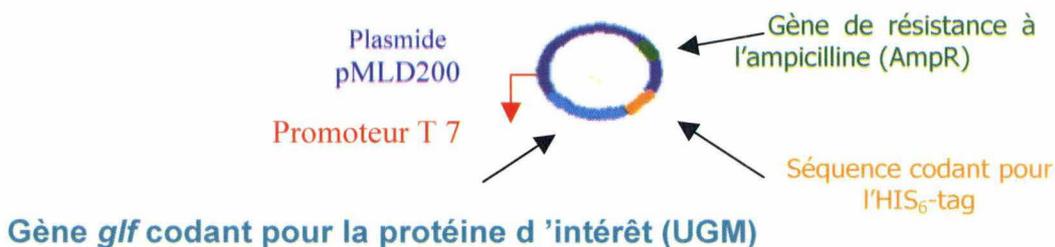


Figure 20. Plasmide pMLD200.

Le promoteur T7 (promoteur fort) situé en amont des allèles mutés permet la surexpression des protéines d'intérêt. Le promoteur T7 est induit grâce à un analogue du lactose, l'IPTG (IsoPropyl- β -D-thiogalactopyranoside).

L'expression du gène cible ne peut commencer que lorsque la T7 ARN polymérase synthétisée par *E. coli* vient se lier au promoteur T7. Mais, il y a un répresseur (LacI) qui est fixé à l'opéron *lac* qui bloque l'interaction de celui-ci avec l'ARN polymérase. Par conséquent la T7 ARN polymérase ne peut pas transcrire les gènes cibles. L'interaction entre l'ARN polymérase et le promoteur *lac* devient possible quand l'IPTG est présent dans la cellule. En effet, l'IPTG se lie au répresseur LacI, le rendant ainsi inactif.

La transcription est aussi régulée par la présence d'un autre répresseur : le lysosome T7. Celui-ci inhibe la T7 ARN polymérase qui serait éventuellement formée en l'absence d'IPTG. La présence de ce lysosome T7 est due au fait que la souche bactérienne employée contient le plasmide

pLysS qui code pour cette enzyme. Dans le cas des mutants, la souche utilisée pour la surexpression contenait le plasmide pRiL et non pLysS. Le plasmide pLysS est un plasmide favorisant la lyse cellulaire et le plasmide pRiL permet de contrer certains biais (encode des tRNA supplémentaires), ces deux plasmides portent la résistance au chloramphenicol.(figure 21).

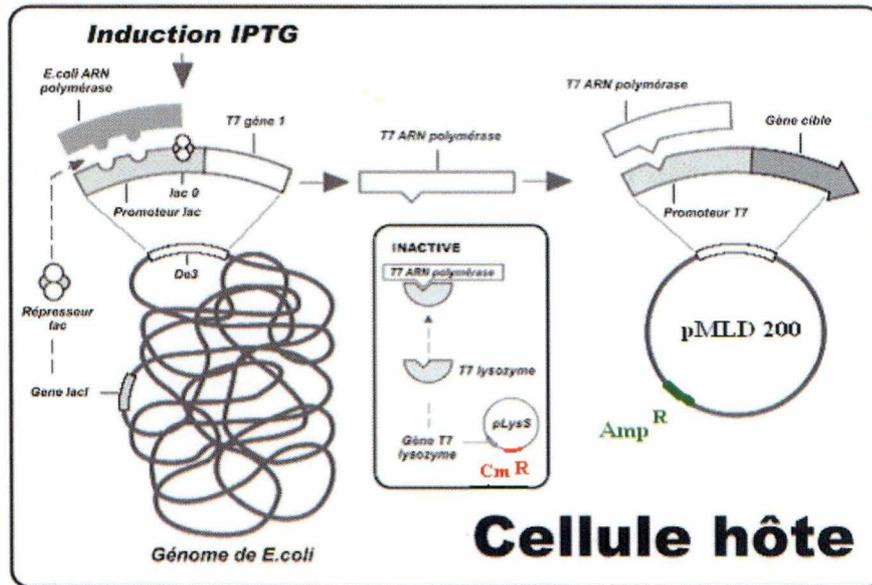


Figure 21. Représentation schématique de la régulation de l'expression de protéines recombinantes à partir du pMLD200 dans *E. coli* BL21 pLysS.

3.1.1. Purification des UGM mutées par colonne IMAC :

Dans le but de purifier nos protéines d'intérêt, nous avons employé le plasmide pMLD200 contenant des allèles de la *glf*, précédés du promoteur T7. Ce plasmide contient en outre une séquence codant pour une étiquette de six histidines nommée usuellement His₆-tag. Cette queue de six histidines permet la purification par chromatographie IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) sur une colonne d'affinité au Ni²⁺. Ces différentes étapes sont représentées sur le chromatogramme reproduit à la figure 22.



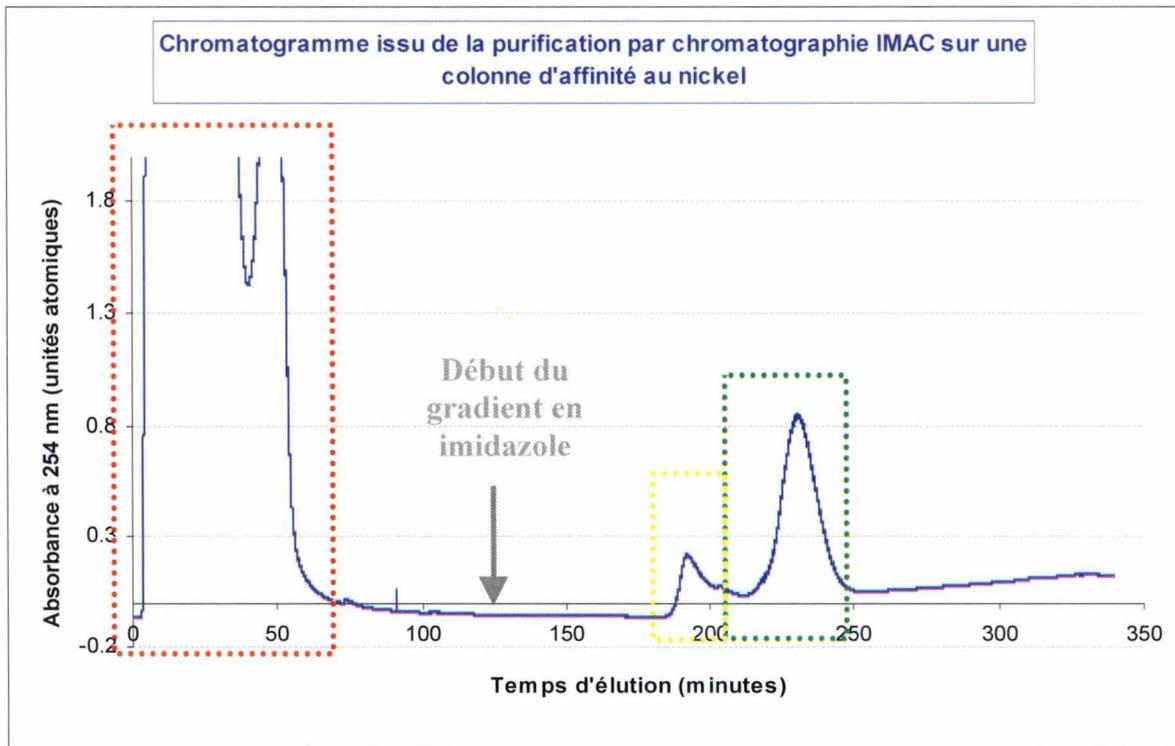


Figure 22. Chromatogramme de l'absorbance UV-visible à une longueur d'onde de 254 nm de l'UGM wild type, avec laquelle on va faire la comparaison avec les mutants. Grâce au mémoire de Ludivine Genon, du département de Chimie Biologique Structurale, qui nous a apporté les résultats de l'enzyme normale.

En pointillés rouges figure le *flow through*, qui contient les protéines et autres impuretés éluées dès le début de la purification. Dans l'encadré en traits pointillés verts, on peut visualiser le pic d'élution de l'UGM. Ce pic apparaît après un gradient d'environ 40% en éluant B (solution avec 0,5 M d'imidazole). En pointillés jaunes, on retrouve un pic correspondant à un composé inconnu qui est élué avant l'UGM. Ce pic « parasite » se retrouve lors de toutes les purifications IMAC, il pourrait par exemple s'agir de protéines endogènes de *E. coli*, qui présentent une affinité modérée pour le support. Le gel SDS-PAGE correspondant à cette purification est représenté à la figure 24.

On peut facilement suivre l'accrochage et l'élution de l'UGM sur la colonne d'affinité au nickel. En effet, l'UGM étant une flavoprotéine, ce qui lui donne une couleur jaune. Cette couleur jaune nous permet de suivre son passage sur la colonne au nickel (figure 23). Cet effet n'a malheureusement pas pu être observé pour les mutants.



Figure 23. Purification de l'UGM « sauvage » sur la colonne d'affinité au nickel. Grâce à la couleur jaune du cofacteur flavinique, il est aisé de suivre l'élution de l'enzyme.

La figure 24 représente un gel SDS-PAGE réalisé après purification par chromatographie d'affinité IMAC (voir la partie matériel et méthodes). L'UGM d'*E. coli* a un poids moléculaire de 42 953 Da. La protéine UGM est déjà visible dans l'extrait brut, et n'est pas détectée dans les



fractions qui précèdent l'élution. Par contre, l'UGM est facilement détectée dans les fractions de l'élution.

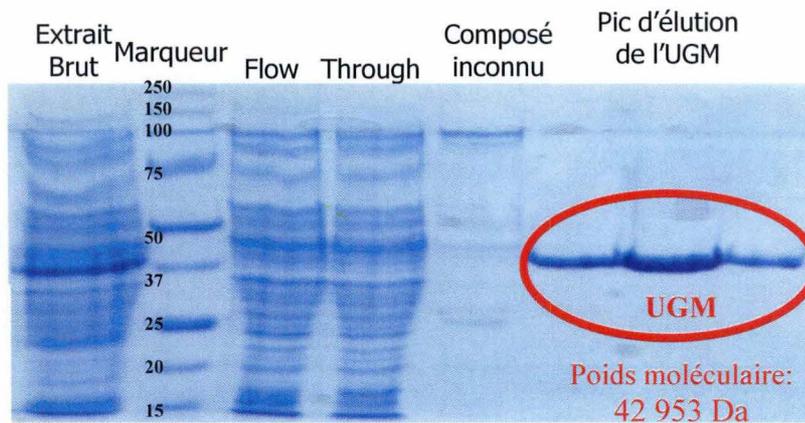


Figure 24. Représentation du gel SDS-PAGE correspondant aux différentes fractions récoltées lors de la purification IMAC de l'UGM wild type. La bande de migration du marqueur nous donne une échelle de poids moléculaires, ceux-ci sont indiqués en kDa sur le gel.

Sur ce gel SDS-PAGE, l'intensité de la bande détectée dans les fractions éluées nous indique que la protéine est présente en quantités importantes. La purification de l'UGM par IMAC nous a permis d'éliminer beaucoup d'autres protéines présentes après la lyse cellulaire.

La même expérience a été réalisée avec les souches de *E. coli* BL21(DE3)pLysS avec des plasmides pMLD200 porteurs de mutation. Ces clones ont été mis en culture (milieu 2YT avec ampicilline et chloramphenicol, dans un volume de 50 ml et avec un induction par l'IPTG pendant 18 heures quand la D.O. a été de 0.8). Les cellules ont été récupérées par centrifugation et lysées par sonication. Les lysats ou extraits bruts (EB) ont ensuite été centrifugés (pendant 30 minutes à 4000 r.p.m. à 4°C) afin de séparer le culot bactérien (CB) du surnageant. Les fractions EB (soluble) et CB ont été déposées sur gel SDS-PAGE (figure 23) afin de déterminer (1) si une bande pouvait être détectée au poids moléculaire attendu de l'UGM dans les extraits bruts, et (2) si l'UGM était produite sous forme soluble ou plutôt emprisonnée dans les culots bactériens (CB), vraisemblablement insoluble. Dans le cas de certaines protéines mutées (mutants H59Q et M349C), on a retrouvé une petite quantité d'UGM dans le culot bactérien et il n'y en a pas dans le surnageant (Figure 23).

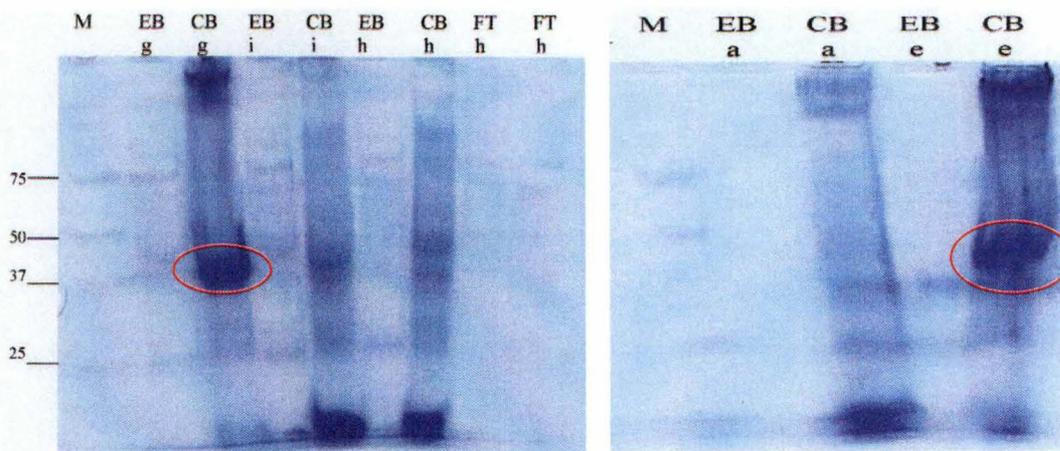




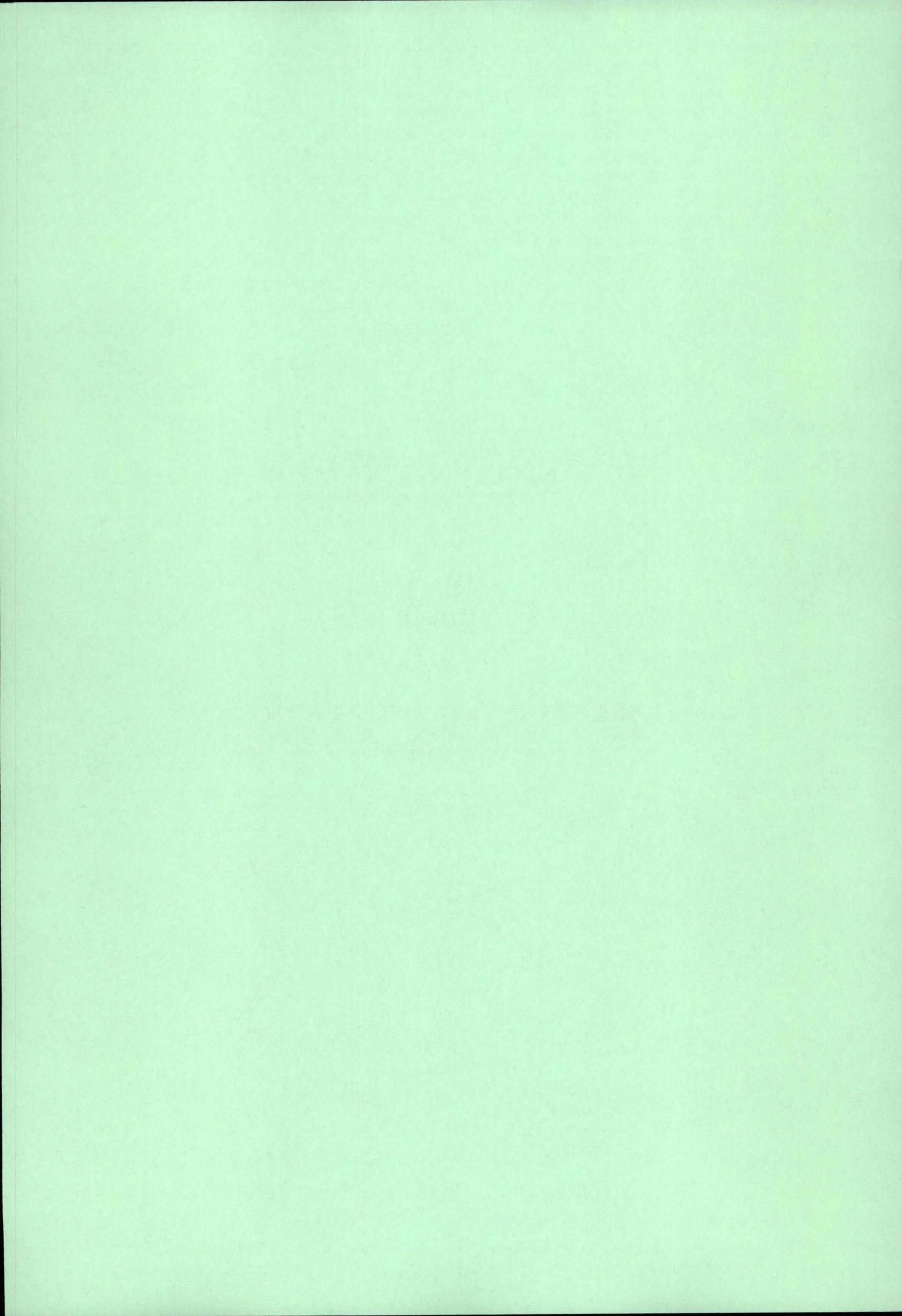
Figure 23. Gel SDS-PAGE des surnageants (Extrait brut) et culot bactérien pour les 5 protéines mutantes. **EB** : Extrait brut. **CB** : Culot bactérien. **a** : mutant R278K. **e** : mutant H59Q. **g** : mutant M349C. **h** : mutant M349A. **i** : mutant M349L. En rouge la bande que correspondre à l'UGM.



DISCUSSION

ET

PERSPECTIVES



La tuberculose est un grave problème de santé publique et pour la combattre il nous faut une meilleure connaissance des caractéristiques moléculaires du pathogène. Le microorganisme pathogène responsable de la tuberculose humaine est *Mycobacterium tuberculosis*. Il est transmis d'une personne à l'autre via les sécrétions pulmonaires.

Nous savons qu'un microorganisme pathogène est celui qui vit sur ou dans un autre organisme vivant, appelé hôte, où il obtient les nutriments nécessaires pour sa croissance et sa reproduction. Il est important de distinguer les termes *infecté* et *malade*. Dans une maladie, l'hôte est endommagé d'une certaine manière, tandis que lors de l'infection, le microorganisme peut s'être établi et croître dans l'hôte sans causer de dommages.

L'invasion par un microorganisme pathogène cause des dommages démontrables à l'endroit où il se situe. Les parasites intracellulaires comme *Mycobacterium tuberculosis* peuvent se multiplier dans les cellules phagocytaires et donner naissance généralement à des maladies chroniques. Tous les microorganismes pathogènes ont des systèmes spécifiques, codifiés dans leur génome qui leur permet de mener à bien cette pathogénicité. Ces systèmes consistent en la production de substances (comme les toxines de *Staphylococcus*) ou d'enzymes (coagulase, collagénase,...) ou bien de composants.

1. Discussion générale

Cette mémoire essaye de nous approcher un peu à la connaissance et la compréhension de la bactérie qui nous occupe : *Mycobacterium tuberculosis*. Nous intriguent surtout, les systèmes de survie et la multiplication qu'ont ces bactéries pour être maintenue dans le corps de ses hôtes sans être détruites. Ces faits, nous guident pour chercher les réponses.

Pour toutes les bactéries, l'enveloppe qu'ils possèdent est très importante puisque c'est cette paroi qui les isole du milieu externe éventuellement agresseur. Pour cette raison, ont commencé les recherches sur la structure et la composition de la paroi de *Mycobacterium tuberculosis* et on a pensé qu'il est dans sa paroi où peuvent résider certaines des clés de leur pathogénicité. On peut affirmer ceci pour plusieurs raisons.

La première est que la composition et la structure de la paroi de *Mycobacterium* diffère beaucoup de celle des autres bactéries typiques comme *B. subtilis*. En effet, la couche externe qui entoure *Mycobacterium* est constituée à 60% d'acides mycoliques. Ceux-ci sont en association avec des acides lipidiques plus largement retrouvés chez les bactéries. Mais ce sont les acides mycoliques qui donnent leur nom à tout le genre *Mycobacterium*.

La deuxième est que dans le genre *Mycobacterium* lui-même, il y a certaines différences de composition dans la paroi, entre les souches pathogènes et celles qui ne le sont pas. C'est le cas d'un sucre (UDP-Galactofuranose) présent dans une souche pathogène de *Mycobacterium*, d'autres bactéries comme *Klebsiella*, *Nocardia*, *Mycoplasma* et *Clostridium*, des protozoaires comme *Leishmania* et *Trypanosoma*, mais aussi chez des champignons comme *Penicillium* et *Aspergillus* ; et ce sucre n'est pas présent dans des espèces non pathogènes de ces mêmes genres (Koplin R 1996). Plus important, on ne retrouve pas ce sucre chez eucaryotes. L'UDP-Galactofuranose, participe à la formation de chaînes de D-Galactane. Ces chaînes, encore appelées arabinogalactanes, ont un squelette de galactoses qui comporte des ramifications arabinoses. Or, dans le cas de quelques espèces pathogènes, dans les chaînes de galactane, l'entité galactose est sous forme de pyranose au lieu de la forme furanose. Quand on étudie la réaction qui catalyse la formation de l'UDP-Galactofuranose, on observe que la réaction n'est pas favorable à la formation de l'isomère furanose. Toutefois en présence de l'enzyme qui catalyse cette réaction, l'UDP-Galactopyranose



mutase, la réaction est beaucoup plus favorable, (Liu *et al.* en 2000). Ce changement est dû à l'existence d'une autre enzyme, l'UDP-Galactofuranose transférase, qui transforme rapidement le produit de réaction (l'UDP-Galactofuranose) et le transfère ensuite à la chaîne galactane.

Étant donné les implications de cette réaction, notre travail s'est centré sur l'enzyme UDPGalactopyranose mutase. Son mécanisme de réaction n'est pas très clair, mais plusieurs hypothèses ont été proposées comme celle de la formation d'un intermédiaire bicyclo-acétal (Caravano 2003), soit la réaction se faisait avec un résidu du site actif comme nucléophile (Barlow J.N. 2000), soit avec le FAD comme donneur monoélectronique (Field R.A. 2003). En 2005, Beis K. a démontré que l'enzyme a comme cofacteur de réaction le FAD chez *Mycobacterium*. On garda alors comme hypothèse du mécanisme d'action celle de la réaction avec le FAD comme nucléophile (Soltero-Higgin M. 2004).

Des études effectuées avec des inhibiteurs et des analogues de la réaction ont montré qu'il paraissait plus probable qu'on passe par un oxycarbénium (Zhang Q 2001),

Discussion des résultats

C'est le fait que l'UDP-Galactopyranose mutase est essentielle à la survie de *Mycobacterium tuberculosis* qui nous a décidé à étudier cette enzyme. (Sanders D.R., 2001) De plus, il a été mis en évidence que l'UDP-Galactofuranose est également essentiel à la vie de la bactérie (Caravano en 2003). Ce qui transforme l'UDP-Galactopyranose mutase en une cible intéressante pour combattre la tuberculose humaine.

Ce travail avait comme objectif d'obtenir des enzymes UDP-Galactopyranose mutase de *Mycobacterium tuberculosis* mutées. Les informations données par les mutants permettraient d'éclaircir le mécanisme d'action de l'enzyme.

Pour le choix des mutations, nous avons pris comme référence les résultats obtenus par S. Godfroid en 2005, dans l'étude effectuée sur le site catalytique de l'UDP-Galactopyranose mutase. La modélisation de la protéine a pu mettre en évidence les implications probables de certains acides aminés localisés dans le centre actif ou à proximité dans le mécanisme d'action. La mutagenèse dirigée permet d'obtenir des mutants, ici cette technique était basée sur l'introduction de la mutation au moyen d'amorces de PCR qui la portent.

Au total, neuf mutations sont proposées dans quatre acides aminés conservés ; nous sommes parvenus à construire cinq d'entre eux. Pour les autres, nous ne sommes pas parvenus à les introduire dans le vecteur de surexpression (le pMLD200 construit par Caravano en 2003) et la séquence codante *glf* mutée reste sous forme de construction intermédiaire, dans la matrice pGEM-T.

Avec les cinq autres constructions, nous avons surexprimé la protéine et nous avons vérifié par gel SDS-Page. Les mutations ont été les suivantes:

R278K, l'arginine 278 qui a été mutée par une lisine.

H59Q, l'histidine 59 qui a été changée par une glutamine

M349C, le méthionine 349 qui a été changée par une cystéine.

M349A, le méthionine 349 qui a été mutée par une alanine.



M349L, le metionina 349 qui a été mutée par une leucine.

Nous avons vu qu'il y avait eu une surexpression de la protéine dans deux des cinq mutants, mais que la protéine ne se retrouvait pas dans la fraction soluble. En effet, lors de la surexpression, l'enzyme produite se retrouve dans le culot bactérien (mutations **H59Q** et **M349C**).

Nous avons tenté une purification d'enzymes mutées afin d'effectuer davantage d'études, comme par exemple de la cristallogénèse ou des tests d'activité. Malheureusement nous n'avons eu le temps que de faire des essais de purification que de deux enzymes, dont la production était indétectable en gel SDS-PAGE. La purification était réalisée à l'aide de la technique de chromatographie IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*). Nous n'avons pas pu purifier des enzymes en quantité détectable.

Comment peut-on expliquer qu'il n'y a eu surexpression que pour deux des cinq protéines mutées ? Cela pourrait être dû à une mauvaise induction, mais cette explication n'est pas très bonne étant donné que les inductions ont été réalisées en même temps et avec les mêmes solutions. Avant de tirer plus de conclusions, il faudrait répéter la surexpression, ce que nous n'avons pu faire faute de temps.

Une autre question à se poser porte sur le fait que lors des surexpressions qui ont fonctionné, pourquoi l'enzyme se retrouve-t-elle dans la fraction non soluble ? La réponse la plus évidente se trouve certainement dans le choix des mutations. En effet, si on prend la mutation où l'histidine 59 est remplacée par une glutamine, l'histidine est proche du FAD et permet une liaison avec le sucre, on croit aussi qu'elle pourrait agir comme accepteur de proton. Le remplacement par la glutamine élimine la possibilité d'agir comme base.

Ce changement a été imaginé pour mettre en évidence un changement dans l'activité de l'enzyme, voire une perte de fonction. Mais ce changement est tellement radical qu'il pourrait produire un changement dans l'acquisition de la structure tridimensionnelle de l'enzyme et la rendre insoluble. Cette explication est la plus simple et permet de comprendre pourquoi une protéine perd sa solubilité. Il est possible que la liaison FAD soit essentielle pour garantir un remplissage correct dans ce système d'expression.

Les deux protéines qu'on a réussi à surexprimer ne sont pas solubles et les deux mutations bouchent des acides aminés proches au FAD (H59Q et M349C). Dans la structure 3D nous pouvons penser que la liaison du FAD à la protéine, en cours de synthèse par exemple, est tellement importante que la structure tridimensionnelle ne peut être obtenue sous cette liaison.

L'autre mutant où il y a eu surexpression de la protéine, n'est pas non plus soluble. Il s'agit d'un changement dans la méthionine 349 par une cystéine. C'est méthionine est un acide aminé hors du centre actif de l'UGM, mais juste à l'arrière du FAD, cofacteur de avec lequel la méthionine 349 pourrait interagir. La cystéine qui a remplacé la méthionine 349, a une structure complètement différente, elle est entre autres petite. Cette variation, pourrait expliquer le comportement de perte de solubilité, puisqu'il n'y a plus cette fonction d'ancrage du FAD, la structure tertiaire pourrait changer beaucoup.

2. Perspectives

Pour mieux comprendre le mécanisme d'action de l'UDP-Galactopyranose mutase de *Mycobacterium tuberculosis*, il est nécessaire de terminer les constructions de mutants ponctuels qui ont été commencées. Ceci permettra de savoir si ces acides aminés ont une véritable implication dans le mécanisme d'action.



Pour terminer les quatre mutants qu'il nous manque, il est nécessaire d'introduire la séquence codante mutée dans le vecteur de surexpression pMLD200. Une fois que nous aurons toutes ces constructions à notre disposition, nous pourrons effectuer la surexpression de toutes les UGM mutées.

Après, nous devons essayer de les purifier dans le cas où la protéine se trouve dans la fraction soluble. Une fois qu'elles sont purifiées nous devons réaliser les tests d'activité pour voir si la protéine est bien active.

Nous pourrions effectuer aussi de la co-cristallisation d'enzymes mutées avec des analogues et des inhibiteurs partiels afin qu'ils nous donnent des idées du mécanisme catalytique ou du mode d'action des inhibiteurs.

Une fois le mécanisme catalytique est connu, nous pourrions chercher des inhibiteurs de l'enzyme qui pourront donner naissance à une nouvelle génération d'antibiotiques antituberculeux. C'est une perspective très importante de nos jours, où le nombre d'infection par la tuberculose croît sans cesse pour deux raisons principales, l'apparition de multirésistance aux antibiotiques classiques et l'infection de patients immunodéprimés avec le SIDA.

MATERIEL

ET

METHODES

1. MATERIEL

Souches et plasmides

1.1.1. Souches :

- *Escherichia coli* DH10B (*Invitrogen*)
- F- *mcrA* D(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*ΔM15 *DlacX74 deoR recA1 endA1 araD139* D (*ara, leu*)7697 *galU galK l- rpsL nupG*.

Cette souche est utilisée pour l'amplification d'un plasmide ou d'un produit de ligation. L'introduction de cet ADN circulaire s'effectue suivant la technique dite de transformation bactérienne.

- *Escherichia coli* BL21 (DE3) pRil (*Novagen*)
- B F⁻ *dcm ompT hsdS* (r_B⁻ m_B⁻) *gal λ* (DE3)

Cette souche est utilisée pour la surexpression des protéines. Le génome bactérien comprend le gène *lacI* codant pour le répresseur de la T7 ARN polymérase. La souche employée contient le plasmide pRil qui porte un gène de résistance au chloramphénicol.

1.1.2. Plasmides :

- pMLD200

Ce plasmide a été construit au laboratoire du Professeur P. Sinay, Ecole Normale Supérieure, Département de Chimie, UMR-8642 du CNRS, 24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France.

Il contient le gène *Glf* codant pour l'UGM de *E.coli* précédé du promoteur T7. Ce gène contient en outre une séquence codant pour une étiquette de six histidines nommée usuellement His₆-tag. Cette queue de six histidines permet la purification par chromatographie IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) sur une colonne d'affinité au Ni²⁺.

- pGEM-T easy (vecteur T avec fl *oriR*, Amp^r)

Ce plasmide a été utilisé dans ce travail pour identifier plus facilement le gène *Glf* muté. L'isolation de l'insert permet plus facilement la ligation du gène dans le vecteur pMLD200 et de surexprimer alors la protéine.

Solutions et milieux

1.1.3. Solutions :

Electrophorèse gel d'agarose :

Tampon TAE 50x

Tris-HCl pH 8,0.....40 mM
 EDTA.....50 mM
 Acide acétique glacial.....20 mM
 Porter à un volume de 1000 ml avec de l'eau distillée.

Solution d'alourdisseur

Glycérol.....50%
 EDTA.....100 mM
 SDS.....1%.
 Bleu de bromophénol ou méthyl orange

Lyse cellulaire :

Tampon PBS 20X

Na ₂ HPO ₄	22.98 g/l
KCl.....	4 g/l
NaCl.....	160 g/l
KH ₂ PO ₄	4 g/l

PBS Triton-X 100 (octyl phenol ethoxylate) (500ml)

PBS 10 X.....	50 ml
Triton-X 100.....	0.5 g
Eau distillée.....	450 ml

Tampon PBS 1X modifié

Na ₂ HPO ₄	1.14 g/l
KCl.....	0.2 g/l
NaCl.....	25.5 g/l
KH ₂ PO ₄	0.2 g/l

PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)
(Inhibiteur de protéases à sérine) 100 mM

Purification par chromatographie IMAC :

Eluant A : Tampon phosphate modifié (pH 7.4)

- 20 mM de tampon phosphate 0.1 M
- 0.5 mM de MgCl₂,
- 0.1 % en β- mercaptoéthanol
- KCl 200 mM
- Imidazole 20 mM

Eluant B : Tampon phosphate modifié (pH 7.4)

- 20 mM de tampon phosphate 0.1 M
- 0.5 mM de MgCl₂
- 0.1 % en β- mercaptoéthanol
- KCl 200 mM
- Imidazole 500 mM

Electrophorèse SDS-PAGE :

Tampon SDS Page 10X

Tris base : 30.35 g (0.250 M)

Glycine : 144 g

SDS : 10 g

Porter à 1l avec eau bidistillée

Bleu de Coomassie

Bleu de Coomassie R : 0.25 g

Méthanol technique : 45 ml

Acide acétique technique : 10 ml

Porter à 100 ml avec de l'eau désionisée

Solution de décoloration

Méthanol technique : 300 ml

Acide acétique technique : 100 ml

Porter à 1l avec de l'eau désionisée

1.1.4. Antibiotiques, IPTG et X-gal :

Nom	Abrév.	Solution de dissolution	Concentration stock (1000X)	Concentration finale
<i>Ampicilline</i>	<i>Amp</i>	<i>H₂O</i>	100 mg/ml	100 µg/ml
<i>Chloramphénicol</i>	<i>Cm</i>	Ethanol 100%	20 mg/ml	20 µg/ml
<i>Kanamycine</i>	<i>Kan</i>	<i>H₂O</i>	50 mg/ml	50 µg/ml
<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside</i>	<i>IPTG</i>	<i>Ethanol 70%</i>	100 mM	1 mM
<i>5-bromo-4-chloro-3-indoyl-βD-galactopyranoside</i>	<i>X-gal</i>	<i>Diméthylformamide</i>	2 mg/ml	20 µg/ml

Tableau 1. Préparation des antibiotiques, IPTG et X-gal. Stérilisation au moyen d'un filtre de 0.22 µm (Millipore) avant d'aliquoter, stockage à -20°C.

1.1.5. Milieux de culture :

Après leur préparation, tous les milieux de culture sont à autoclaver (121°C pendant 20 min).

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
<i>Hydrolysate de caséine (peptone)</i>	10 g	10 g
<i>NaCl</i>	5 g	5 g
<i>Extrait de levure</i>	5 g	5 g
<i>Agar</i>	-	15 g

Tableau 2. Milieu Luria Bertani (LB) : Milieu pour *E. coli*

Pour un litre d'eau désionisée	Forme liquide	Forme solide
<i>Mix pour LB liquide</i>	20 g	35 g
<i>Hydrolysate de caséine (peptone)</i>	6 g	6 g
<i>Extrait de levure</i>	5 g	5 g
<i>Agar</i>	-	1 g

1. Tableau 3. Milieu 2 YT : Milieu riche pour *E. coli*

2. MÉTHODES

Techniques relatives à l'utilisation d'ADN

2.1.1. Extraction d'ADN plasmidique :

Cette technique permet d'isoler et de purifier des plasmides. La purification de l'ADN plasmidique comprend 5 étapes : la lyse alcaline des bactéries, l'élimination des protéines et des débris cellulaires, la précipitation de l'ADN plasmidique, le lavage de l'ADN et enfin sa resuspension.

Pour ce faire, plusieurs protocoles sont possibles : purification sur colonne (High Pure Plasmid Isolation Kit de Roche), kit Nucleospin[®] (Marcherey-Nagel), ou encore :

Protocole :

- Colonie isolée + 5 ml de milieu LB + antibiotique approprié
- Incubation à 37°C toute la nuit
- Centrifugation de 1 à 1.5 ml à 12500 rpm pendant 5 minutes
- Élimination du surnageant
- Ajout de 300 µl de solution P1 (4°C) + resuspendre
- Ajout de 300 µl de solution P2 + retourner l'éppendorf
- Laisser 5 minutes à t° ambiante
- Ajout de 300 µl de solution P3 + retourner l'éppendorf
- Laisser 10 minutes sur glace
- Centrifuger 15 minutes à 12500 rpm à 4°C
- Récupérer le surnageant
- Addition de 0.7 volume d'isopropanol (~ 630 µl) + agiter l'éppendorf
- Centrifuger à 12500 rpm 15 minutes à 4°C
- Enlever le surnageant
- Ajouter 300 µl d'éthanol 70% (-20°C)
- Centrifuger à 12500 rpm 5 minutes à 4°C
- Enlever le surnageant
- Sécher
- Ajouter 20 µl d'eau

2.1.2. Restriction d'ADN plasmidique purifié :

Le clivage de l'ADN double brin de manière spécifique se fait avec des enzymes de restriction qui sont des endonucléases. Celles-ci reconnaissent des sites spécifiques (qui sont des sites de restrictions), constitués par une séquence souvent palindromique, de 4 à 8 paires de bases. La coupure peut former des "bouts protrudants" ou générer des bouts francs. La ligation d'un bout protrudant n'est possible qu'avec un bout protrudant complémentaire. Les enzymes de restriction et leurs tampons sont fournis par Roche Molecular Biochemical et Biolabs.

Protocole courant :

- 1 µl d'ADN plasmidique purifié.
- 1 µl d'enzyme de restriction.
- 2 µl de tampon de restriction 10X
- Porter le volume à 20 µl avec de l'H₂O distillée stérile.

Incubation d'une heure à 37°C. Après cette incubation, il faut inactiver les enzymes à une température qui varie suivant l'enzyme utilisée (*Xba I*, à 65°C pendant 20 minutes. *Bgl I*, à 85°C pendant 20 minutes).

Enzyme	Site	Tampon
<i>Bgl I</i>	NNNN/NGGC	H
<i>Bgl II</i>	A/GATCT	A, B, M ou H
<i>Xba I</i>	T/CTAGA	A ou H

Tableau 4. Enzymes de restriction avec ses sites de restriction et ses tampons.

L'ADN restreint est ensuite séparé par une électrophorèse en gel d'agarose selon la taille des fragments. Pour cela, il faut ajouter un dixième du volume de tampon de dépôt d'électrophorèse au produit de restriction et déposer sur gel d'agarose.

2.1.3. Ligation :

Pour lier de manière covalente des fragments d'ADN qui ont été coupés par restriction enzymatique. L'ADN ligase du phage T4 est utilisée car celle-ci catalyse la formation de liens phosphodiester entre l'hydroxyle 3' d'une extrémité d'ADN et le phosphate 5' de l'autre extrémité. Pour être active l'enzyme nécessite la présence d'ATP et d'ions Mg^{++} .

Alors qu'on mélange les deux fragments à liguer dans un rapport moléculaire vecteur et insert de 1/3 (faire attention à la taille des fragments et à leur concentration que l'on identifie sur gel d'agarose). Ajouter 1 μ l de DNA ligase T4 (Invitrogen) ainsi que 1/5 du volume total de ligation de tampon de ligation 5X. Compléter avec de l'eau distillée stérile et incubé à 16°C pendant toute la nuit ("over night").

2.1.4. Electrophorèse d'ADN en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera donc inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de tailles connues (le marqueur). Les fragments sont visualisés grâce au bromure d'éthidium. Le bromure d'éthidium se lie à l'ADN bicaténaire en s'intercalant entre les bases de la double hélice. Etant fluorescente, la molécule marque l'ADN et celui-ci est ainsi visible sous les UV. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à la quantité d'ADN présente. Ainsi en connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de taille, il est possible d'estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison de l'intensité de la fluorescence.

Protocole :

- Pour un gel d'agarose 1%, dissoudre 0,8 g d'agarose (Molecular Biology Grade) dans 80 ml de tampon TAE 1X.
- Porter à ébullition. Quand la solution est tiède ($\sim 60^\circ\text{C}$), couler le gel sur le support *ad hoc* muni d'un peigne permettant de faire les puits de chargement et ajouter 2 μ l de bromure d'éthidium (0,1 μg / ml) avant la polymérisation du gel.
- Charger les échantillons auxquels on a ajouté au moins un dixième de solution d'alourdisseur, sans oublier de charger le marqueur moléculaire en parallèle (5 μ l/puits). Le marqueur utilisé est l'Hyperladder I (Biolone).
- La différence de potentiel appliquée est d'environ 100 V, l'ADN chargé négativement migre de la borne négative vers la borne positive.
- Visualiser l'ADN sous UV.

2.1.5. Purification sur gel d'agarose

Cette technique permet de récupérer un fragment d'ADN en gel d'agarose isolé au cours de l'électrophorèse, principalement afin d'utiliser ce fragment dans des constructions futures. Nous avons utilisé le Kit MBI Fermentas. Cette méthode repose sur l'utilisation de billes de silice auxquelles l'ADN adhère spécifiquement, les sels et les impuretés peuvent ainsi être éliminés. Le protocole provient du "DNA Extraction Kit" de MBI Fermentas.

2.1.6. Polymerase chain reaction (PCR)

Cette technique est utilisée pour amplifier un fragment d'ADN d'intérêt (amplicon). Les séquences bordant le fragment doivent être connues pour pouvoir concevoir des amorces oligonucléotidiques (encore appelées primers). La matrice d'ADN est dénaturée par chauffage ($\sim 95^\circ\text{C}$ pendant 10 minutes) en présence d'un excès d'oligonucléotides et de dNTP's. Le mélange est ensuite soumis à une diminution de température (en fonction des amorces, de ses T_m , qui est la température de *melting*. Celui-ci se calcule de la façon suivante: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$). C'est-à-dire entre 50-70°C), qui permet l'hybridation spécifique des amorces. La séquence comprise entre

les deux amorces est amplifiée par une ADN Polymérase thermorésistante (la Taq DNA Polymérase de Biotools ou l'Expand High Fidelity de Roche) à une température optimale pour le fonctionnement de la polymérase (~72°C pendant 10 minutes). Nous avons utilisé la Taq DNA Polymérase (Biotools) pour les PCR diagnostiques et la Expand High Fidelity (Roche) pour les clonages, parce que le taux de mutations introduites est relativement élevé. Le cycle de dénaturation/hybridation/élongation est répété 30 fois.

Réactifs	Quantité
<i>ADN portant la région à amplifier (insert)</i>	~20 ng
<i>Tampon 5X correspondant à la polymérase</i>	5 µl
<i>Mélange dNTP's (5 mM pour chaque)</i>	1 µl
<i>Primer 1 (10 µM) (F ou R)</i>	2 µl
<i>Primer 2 (10 µM) (Fm ou Rm)</i>	2 µl
<i>High Fidelity polymérase</i>	0,8 µl
<i>Eau distillée et autoclavée</i>	Porter à 25 µl

Tableau 5. PCR 1 pour faire les « demi-inserts » mutés.

Réactifs	Quantité
<i>ADN pour lier : Produit PCR1 F (demi-insert muté)</i>	~20 ng
<i>ADN pour lier : Produit PCR1 R (demi-insert muté)</i>	~20 ng
<i>Tampon 5X correspondant à la polymérase</i>	5 µl
<i>Mélange dNTP's (5 mM pour chaque)</i>	1 µl
<i>Primer F (10 µM)</i>	2 µl
<i>Primer R (10 µM)</i>	2 µl
<i>Taq polymérase</i>	0,8 µl
<i>Eau distillée et autoclavée</i>	Porter à 25 µl

Tableau 6. PCR 2 pour faire les inserts complets et mutés.

	Étape	Température (°C)	Durée
1	<i>Dénaturation de la matrice</i>	95	10 min.
2	<i>Dénaturation de la matrice</i>	95	1 min.
3	<i>Hybridation spécifique des amorces</i>	54 (pMLD200) et 52 (pGEM-T easy)	40 sec.
4	<i>Amplification</i>	72	1 min.
5	<i>Cycles</i>	Retour à l'étape 2	30 fois
6	<i>Amplification</i>	72	10 min.
7	<i>Fin</i>	4	indéfiniment

Tableau 7. Programme thermocycleur

2.1.7. Séquençage

La réaction de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). Cette technique est basée sur la polymérisation d'un fragment d'ADN par PCR, à partir d'une amorce nucléotidique. Le mélange de réaction contient des déoxynucléotides normaux et des didéoxynucléotides marqués à la fluorescéine. La présence de didéoxyribonucléotides arrête la polymérisation, ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués représentant la séquence d'ADN. Chacun va émettre à une longueur d'ondes bien précise. Pour séquencer les fragments d'ADN, nous avons fait :

1. Purification des produits PCR

Les produits de réaction PCR à séquencer sont d'abord purifiés sur colonne à l'aide du High Pure Plasmid Isolation Kit de Roche, en suivant le protocole du fabricant.

2. Réactions de séquençage

Les réactions de séquençage ont été réalisées par GENOME express (Meylan, France).

3. Analyse des séquences

Les visualisations et alignements de séquence ont été réalisés au moyen du programme GEXbyweb. Ensuite, les séquences ont été comparées avec celle du gène *wild type* afin de vérifier qu'ils portaient bien la mutation.

Techniques relatives à l'utilisation de bactéries

2.1.8. Préparation de cellules compétentes

C'est un procédé basé sur le principe de la transformation naturelle observée chez certains types de bactéries (1928, Frederick Griffith). La transformation *artificielle* est précédée d'un traitement chimique ou enzymatique de la paroi bactérienne avant sa mise en contact avec l'ADN. Il faut arriver à un état physiologique appelé : *l'état de compétence* qui n'apparaît qu'à certains stades de la division cellulaire et seulement chez une fraction de la population bactérienne, dans laquelle, ces bactéries vont prendre de l'ADN exogène.

Protocole :

- Lancer une préculture et laisser incuber à 37°C sous agitation jusqu'à que la D.O.₆₀₀ (Densité optique à une longueur d'onde de 600nm ($\lambda=600\text{nm}$) mesurée avec un spectrophotomètre) atteigne 0,3-0,4.
- Laisser sur glace 10 minutes.
- Centrifuger à 4000 r.p.m. pendant 10 minutes à 4°C.
- Eliminer le surnageant et resuspendre dans 80ml de CaCl₂ ou H₂O stérile glacés (suivant que nous voulons faire une transformation par choc thermique ou électrique).
- Répéter la centrifugation et resuspension 3 fois de suite et la quatrième fois, ajouter seulement 8 ml soit de CaCl₂, soit d'H₂O et ainsi que 50 mM de Glycérol 15% stérile et froid.
- Aliquoter en eppendorf et stocker à -80°C.

Il faut tester la compétence des cellules avec une transformation de 100 µl de cellules compétentes et 1 µl de pUC19 (0,1 ng/µl) qui est un plasmide porteur de résistance à l'ampicilline. Nous pouvons alors étaler sur boîte contenant de l'ampicilline. Après une nuit d'incubation à 37°C, le comptage des colonies est multiplié par 10 et par 10 000. Le résultat doit être au minimum de 10⁶ UFC/µg pour que les cellules soient compétentes.

2.1.9. Transformation bactérienne par choc thermique

La transformation bactérienne consiste à faire entrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) à l'intérieur d'une bactérie dont la membrane a été rendue perméable à l'ADN par un traitement au CaCl₂ + glycérol 15%. La souche utilisée est *E. coli* DH10B.

Protocole :

- Placer 100 µl de bactéries CaCl₂ compétentes dans un eppendorf sur glace.
- Une fois les bactéries décongelées, ajouter de 1 à 8 µl du plasmide.
- Laisser sur glace pendant 45 minutes.
- Choc thermique pendant 2 minutes dans un bain-marie à 42°C.
- Ajouter 1 ml de milieu LB liquide.
- Incuber une heure à 37°C, sous agitation.
- Etaler 100 µl sur un milieu sélectif approprié et laisser incuber toute la nuit à 37°C.
- Centrifuger le reste pendant 5 minutes à 5000 rpm puis resuspendre le culot dans environ 150 µl.
- Etaler le tout sur milieu sélectif approprié et laisser pousser toute la nuit à 37°C.

2.1.10. Transformation bactérienne par choc électrique

Pour cette transformation il faut que tous les éléments soient sans sels et pour ce faire, l'échantillon d'ADN à transformer (plasmide) est dialysé sur un filtre de 0,025 μm avec de l' H_2O bidistillée pendant 30 minutes.

Protocole :

- Sur glace, ajouter le plasmide dans un eppendorf qui contient les cellules compétentes et mélanger.
- Transférer dans une cuvette d'électroporation. Chasser les bulles éventuelles. Travailler sous la hotte et sur glace.
- Programmer l'électroporateur à 2,5 kv, 25 μF et 200 Ω . Mettre la cuvette et appuyer sur le bouton jusque entendre un bruit.
- Immédiatement ajouter 1ml de milieu 2YT et laisse à 37°C sous agitation pendant 30 minutes.
- Etaler 100 μl sur un milieu sélectif approprié et laisser pousser toute la nuit à 37°C.
- Centrifuger le reste pendant 5 minutes à 5000 rpm puis resuspendre le culot dans environ 150 μl .
- Etaler le tout sur milieu sélectif approprié et laisser pousser toute la nuit à 37°C.

2.1.11. Test blanc/bleu

Ce test permet de détecter facilement si les bactéries DH10B portent un plasmide recombinant. En effet, les éléments génétiques portés par la souche DH10B ne lui permettent pas d'avoir une activité β -galactosidase normale. Il peut néanmoins y avoir une complémentation intragénique avec un plasmide apportant *LacI* (fragment non opérationnel du gène de régulation de l'opéron lactose) et un fragment du gène *lacZ* (partie N-terminale de la β -galactosidase). Lorsque cette complémentation est effectuée, la bactérie possède une β -galactosidase fonctionnelle. Celle-ci est mise en évidence par son action sur le X-gal, substrat chromogène qui donne un composé bleu lorsqu'il est clivé. Quand le test est blanc, il met en évidence les bactéries ayant acquis un plasmide qui contient un insert au niveau du site multiple de clonage car celui-ci disrute le gène *lacZ'* ; la β -galactosidase n'est donc plus fonctionnelle. Quand le test est bleu, la β -galactosidase est fonctionnelle, le gène *lacZ'* n'est pas disrupté. L'IPTG, dans le milieu de culture, permettra l'expression de *lacZ* car il inhibe *lacI*. Pour ce faire, des boîtes LB contenant X-gal, IPTG et l'antibiotique approprié sont préparées.

Techniques relatives à l'utilisation de protéines

2.1.12. La surexpression de l'UGM dans *E.coli*

Protocole :

- Lancer 3 x 7 ml de préculture (dans du milieu 2YT additionné de l'antibiotique approprié) et laisser incubé sous agitation toute la nuit à 37°C. Dans notre cas, les antibiotiques sont l'ampicilline dont le gène de résistance est porté par le pMLD200 et le chloramphénicol pour le pRiL).
- Ensuite lancer les cultures, 3 x 250 ml de milieu à partir de 2.5 ml de préculture. A ce moment la DO (densité optique) à 600 nm doit être de ± 0.02 (blanc = 2YT).
- Après environ 3h d'incubation à 37°C, lorsque la DO atteint $\pm 0.6/0.8$, on peut lancer l'induction à l'IPTG.
- l'induction de l'expression des protéines se fait par ajout de l'IPTG 1 mM (50 μl d'IPTG 1M pour 50 ml de culture). La culture est alors incubée à température ambiante sous agitation pendant 18 heures.
- Récupérer ensuite la solution trouble et centrifuger pendant 30 minutes à une vitesse de 4000 rpm à 4°C, ceci afin de séparer le culot bactérien du milieu de culture

2.1.13. La lyse cellulaire

Protocole :

- Centrifuger 30 minutes à 4000 rpm à 4°C, vider le surnageant et resuspendre le culot bactérien obtenu dans 20 ml de tampon PBS* modifié (18 ml de PBS*, 2 ml de Triton X 10%, 200 µl de PMSF 100 mM). On obtient une solution très visqueuse due à la présence d'ADN. Afin de séparer ces amas de bactéries, passer la solution au vortex durant quelques minutes.
- Lyser les cellules bactériennes par sonication afin de rompre les membranes cellulaires par ultrasons, 10 minutes au programme 4 (puissance de 10 Watts) et sur glace.
- Centrifuger pendant une heure à 4°C à une vitesse de 14.000 r.p.m. afin de séparer le surnageant contenant l'enzyme soluble du culot bactérien. Celui-ci est resuspendu dans du tampon PBS et conservé à -20°C pour d'éventuels tests. La solution de protéines obtenue (extrait brut) est stockée à -20°C.

2.1.14. Purification de l'UGM

La centrifugation nous a permis de séparer le lysat en deux phases, une phase soluble contenant l'UGM et une phase insoluble contenant des corps d'inclusion ainsi que des fragments de parois, etc. Cependant, d'autres composés solubles, tels que des acides nucléiques et des protéines sont présents dans le surnageant récolté.

2.1.15. La purification par chromatographie IMAC

Conditionnement de la colonne :

- Couler la résine de sépharose dans la colonne.
- Faire passer une solution d'EtOH 100% et ajuster le piston.
- Nettoyer la colonne par passage d'eau, EDTA et d'eau.
- Charger la matrice en ions nickel par le passage d'une solution 100 mM de NiSO₄.
- Faire passer de l'eau.
- Conditionner la colonne par passage de l'éluant A.

Protocole de purification :

- Charger l'échantillon (extrait brut) sur une colonne d'affinité aux ions Ni²⁺
- Faire passer un certain volume d'éluant A afin d'élué toutes les protéines qui ne se fixent pas à la colonne, ainsi que les autres impuretés. Cette fraction est appelée le *flow through*.
- Appliquer un gradient en imidazole. Ce gradient se fait par le passage d'une solution allant de 100 % en éluant A à 100 % en éluant B. L'éluant B a la même composition que l'éluant A mais il possède une concentration plus élevée en imidazole (500 mM). La protéine est alors éluée.

2.1.16. Vérification de la pureté et caractérisation

Afin de nous assurer de la pureté de la protéine recueillie, nous avons réalisé un gel d'électrophorèse SDS-Page en condition dénaturante par ajout de β-mercaptoéthanol.

II.3.4.1. Gel d'électrophorèse SDS-Page

Préparation du gel de séparation (*Resolving gel*) 10% :

- 4.1 ml H₂O
- 3.3 ml Acrylamide 30% ; Bis 0.8%
- 2.5 ml de tampon Tris-HCl 1.5 M pH 8.8
- 0.1 ml SDS 10%
- 5 µl Temed
- 50 µl d'ammonium persulfate 10% (APS) (100 mg / 1 ml)

On introduit la solution dans le dispositif, on indique la hauteur du gel avec un trait. Au dessus de ce gel de séparation, on introduit sur environ 1 cm d'épaisseur une solution de butanol saturée en H₂O (cette solution de butanol est saturée en H₂O afin qu'elle en puise pas l'H₂O du gel), ce butanol empêche la polymérisation du gel par l'oxygène, ce qui provoquerait un gradient. On laisse le gel prendre pendant 45 minutes.

Préparation du gel d'empilement (*Stacking gel*) 10% :

- 4.1 ml H₂O
- 3.3 ml Acrylamide 30% ; Bis 0.8%
- 2.5 ml de tampon Tris-HCl 0.5 M pH 6.8
- 0.1 ml SDS 10%
- 10 µl Temed
- 50 µl d'ammonium persulfate 10% (APS) (100 mg / 1 ml).

On élimine la solution de butanol en inclinant le support au dessus de l'évier. On coule ensuite le gel d'empilement jusqu'au bord supérieur de la petite plaque de verre. On glisse immédiatement le peigne dans le gel d'empilement. On laisse polymériser durant 35 min, on retire ensuite doucement le peigne.

Nous avons fabriqué le gel suivant ce mode opératoire. Après polymérisation du gel, 15 µl de solution d'échantillon ont été déposés dans les puits prévus à cet effet. Nous avons ensuite lancé la migration par application d'un potentiel de 200 V.

Après migration, nous avons lavé le gel et l'avons placé dans le colorant (Bleu de Coomassie) pendant 45 minutes. Pour terminer, nous avons décoloré le gel en le laissant quelques minutes dans un bain de solution de décoloration.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barlow, J. N. & Blanchard, J. S. Enzymatic synthesis of UDP-(3-deoxy-3-fluoro)-D-galactose and UDP-(2-deoxy-2-fluoro)-D-galactose and substrate activity with UDP-galactopyranose mutase. *Carbohydr Res* **328**, 473-80 (2000).
- Beis, K. et al. Crystal structures of *Mycobacteria tuberculosis* and *Klebsiella pneumoniae* UDP-galactopyranose mutase in the oxidised state and *Klebsiella pneumoniae* UDP-galactopyranose mutase in the (active) reduced state. *J Mol Biol* **348**, 971-82 (2005).
- Belisle, J. T. et al. Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science* **276**, 1420-2 (1997).
- Blanchard, J. S. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev Biochem* **65**, 215-39 (1996).
- Brennan, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* **83**, 91-7 (2003).
- Caravano, A., Mengin-Lecreulx, D., Brondello, J. M., Vincent, S. P. & Sinay, P. Synthesis and inhibition properties of conformational probes for the mutase-catalyzed UDP-galactopyranose/furanose interconversion. *Chemistry* **9**, 5888-98 (2003).
- Caravano, A., Sinay, P. & Vincent, S. P. 1,4-Anhydrogalactopyranose is not an intermediate of the mutase catalyzed UDP-galactopyranose/furanose interconversion. *Bioorg Med Chem Lett* **16**, 1123-5 (2006).
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M. & Pieters, J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* **97**, 435-47 (1999).
- Field, R. A. & Naismith, J. H. Structural and mechanistic basis of bacterial sugar nucleotide-modifying enzymes. *Biochemistry* **42**, 7637-47 (2003).
- Fullerton, S. W. et al. Potentiometric analysis of UDP-galactopyranose mutase: stabilization of the flavosemiquinone by substrate. *Biochemistry* **42**, 2104-9 (2003).
- Koplin, R., Brisson, J. R. & Whitfield, C. UDP-galactofuranose precursor required for formation of the lipopolysaccharide O antigen of *Klebsiella pneumoniae* serotype O1 is synthesized by the product of the rfbDKP01 gene. *J Biol Chem* **272**, 4121-8 (1997).
- Lee, R. E. S., M. D.; Pickering, L; Fleet, G. W. J. An approach to combinatorial library generation of galactofuranose mimics as potential inhibitors of mycobacterial cell wall biosynthesis: synthesis of a peptidomimetic of uridine 5'-diphosphogalactofuranose (UDP-galf). *Tetrahedron Letters* **40(49)**, 8689-8692 (1999).
- Nassau, P. M. et al. Galactofuranose biosynthesis in *Escherichia coli* K-12: identification and cloning of UDP-galactopyranose mutase. *J Bacteriol* **178**, 1047-52 (1996).
- Pan, F., Jackson, M., Ma, Y. & McNeil, M. Cell wall core galactofuran synthesis is essential for growth of mycobacteria. *J Bacteriol* **183**, 3991-8 (2001).
- Rivas-Santiago, B., Vieyra-Reyes, P. & Araujo, Z. [Cell immunity response in human pulmonary

tuberculosis. Review]. *Invest Clin* **46**, 391-412 (2005).

Sanders, D. A. et al. UDP-galactopyranose mutase has a novel structure and mechanism. *Nat Struct Biol* **8**, 858-63 (2001).

Scherman, M. S. et al. Drug targeting Mycobacterium tuberculosis cell wall synthesis: development of a microtiter plate-based screen for UDP-galactopyranose mutase and identification of an inhibitor from a uridine-based library. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 378-82 (2003).

Soltero-Higgin, M., Carlson, E. E., Gruber, T. D. & Kiessling, L. L. A unique catalytic mechanism for UDP-galactopyranose mutase. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 539-43 (2004).

Stahl, P. D. & Ezekowitz, R. A. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* **10**, 50-5 (1998).

Takayama, K. & Kilburn, J. O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in Mycobacterium smegmatis. *Antimicrob Agents Chemother* **33**, 1493-9 (1989).

Trejo, H. G., Patricia; Porras, Flor; Chevez, Raul; Lascurain, Ricardo; Zenteno, Edgar. Bases moleculares de la interaccion de Mycobacterium tuberculosis con los macrofagos. *Revista Instituto Nacional Enfermedades Respiratorias* **16**, 41-47 (2003).

Weston, A. et al. Biosynthetic origin of mycobacterial cell wall galactofuranosyl residues. *Tuber Lung Dis* **78**, 123-31 (1997).

Yuan, Y., Wen, X., Sanders, D. A. & Pinto, B. M. Exploring the mechanism of binding of UDP-galactopyranose to UDP-galactopyranose mutase by STD-NMR spectroscopy and molecular modeling. *Biochemistry* **44**, 14080-9 (2005).

Zhang, Q. & Liu, H. Mechanistic investigation of UDP-galactopyranose mutase from Escherichia coli using 2- and 3-fluorinated UDP-galactofuranose as probes. *J Am Chem Soc* **123**, 6756-66 (2001).