



HDR

Laurent Kremer

► To cite this version:

Laurent Kremer. HDR. Biochimie [q-bio.BM]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2007. tel-00259336

HAL Id: tel-00259336

<https://theses.hal.science/tel-00259336>

Submitted on 27 Feb 2008

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

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



CNRS - Département des Sciences de la Vie

UMR 5235

**Dynamique des Interactions Membranaires
Normales et Pathologiques**

Université de Montpellier II
Place Eugène Bataillon
34 000 Montpellier

**HABILITATION
A DIRIGER DES RECHERCHES**

Laurent KREMER
Chargé de Recherche INSERM

2007

Sommaire

Curriculum Vitae

1. Etat civil.....	6
2. Titres et diplômes.....	6
3. Fonctions scientifiques.....	6
4. Encadrement scientifique et composition du groupe.....	7
5. Publications scientifiques.....	7
6. Chapitres de livres et articles de revue.....	12
7. Communications scientifiques.....	13
8. Collaborations scientifiques.....	16
9. Financements.....	16
10. Parcours scientifique, principaux centres d'intérêt et domaines d'expertise.....	17

Analyse des Travaux de Recherche antérieurs (1992-2006)

1. Période 1992/1995.....	19
2. Période 1996/2000.....	20
2.1 Généralités sur la paroi mycobactérienne et les acides mycoliques.....	21
2.2 Les premières étapes de la biosynthèse des acides mycoliques.....	22
2.2.1 Identification et caractérisation du lien enzymatique entre FAS-I et FAS-II	
2.2.2 L'acyl Carrier Protein (AcpM) et la malonyl-CoA:AcpM transacylase	
2.2.3 Caractérisation enzymatique de KasA et élongation du méromycolate	
2.3 Etude de nouveaux inhibiteurs de la biosynthèse des acides mycoliques.....	24
2.3.1 Activité antimycobactérienne de la thiolactomycine et de ses dérivés	
2.3.2 La TLM, un inhibiteur des β -kétaoacyl-AcpM synthases KasA et KasB	
2.4 Etudes des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse du LAM.....	25
3. Période 2000/2003.....	26
3.1 Détermination de la structure des LAMs chez diverses espèces mycobactériennes.....	26
3.2 Etude <i>in vitro</i> des fonctions immunomodulatrices des LMs/LAMs.....	27

3.3	Identification et caractérisation d'un nouveau lipide mycobactérien.....	30
3.4	L'isoniazide, un inhibiteur de l'enoyl-AcpM réductase InhA.....	30
4.	Période 2004/2006.....	31
4.1	Inactivation de InhA et KasA chez <i>M. smegmatis</i> et validation de KasA en tant que cible thérapeutique....	32
4.2	Rôle de KasA dans la formation des biofilms chez <i>M. smegmatis</i>	32
4.3	Inactivation de KasB chez <i>M. tuberculosis</i> et rôle dans la survie intracellulaire.....	33
4.4	Identification et caractérisation de substrats phosphorylés par les Sér/Thr protéines kinases en rapport avec la synthèse de composants de la paroi chez <i>M. tuberculosis</i>	34
4.4.1	Les Sér/Thr protéines kinases et la phosphorylation de EmbR par PknH	
4.4.2	La phosphorylation de KasA et KasB module leur activité de condensation	

Projet de Recherche

1.	Le phosphoprotéome du système FAS-II chez <i>M. tuberculosis</i>	38
2.	Identification et caractérisation des arabinosyltransférases de la synthèse du LAM.....	39
3.	La synthèse des acides gras chez <i>Plasmodium falciparum</i>	40
3.1	Contexte du projet et résultats préliminaires	
3.2	Objectifs et perspectives	
4.	Perspectives du projet de recherche.....	41

Bibliographie

Sélection de 10 Publications

Curriculum Vitae

1. Etat civil

Nom patronymique : KREMER

Prénom : Laurent

Date et lieu de naissance : 5 décembre 1968 à Sarreguemines (Moselle)

Situation familiale : marié, 2 enfants

Nationalité : française

Adresse personnelle : 21, Place des Pastels
34 070 Montpellier
Tél : 04 67 82 54 99

Fonction : Chargé de Recherche (CR1) INSERM
CNRS UMR 5235
Université Montpellier II, case 107
Place Eugène Bataillon
34095 Montpellier Cedex 05, FRANCE
Tél : (+33) 4 67 14 33 81
Fax : (+33) 4 67 14 42 86
e-mail: laurent.kremer@univ-montp2.fr

2. Titres et diplômes

1992-1995 : Thèse sous la direction du Pr. A. Capron, INSERM U167, Institut Pasteur de Lille.
"Développement d'un BCG recombinant exprimant la glutathion *S*-transférase de *Schistosoma mansoni* dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre la schistosomiase".
Défendue en décembre 1995, mention très honorable avec félicitations écrites du jury.

1988-1991: Diplôme d'Ingénieur en Biotechnologie de l'Ecole Supérieur de Biotechnologie de Strasbourg. Mention Bien.

1986-1988: DEUG Biophysicochimie, Université Louis Pasteur, Strasbourg. Mention Bien.

1986 : Baccalauréat D, Lycée Jean de Pange, Sarreguemines. Mention Bien.

3. Fonctions scientifiques

Depuis mai 2004 : Chargé de Recherche (CR1) dans l'UMR5235 (CNRS-Université de Montpellier II) dirigée par le Pr. C. Braun-Breton (anciennement UMR5539 dirigée par le Dr H. Vial).

Février 2000-mai 2004 : Chargé de Recherche (CR2) dans l'Unité INSERM U447 dirigée par le Dr. C. Locht, Institut de Biologie de Lille.

1998-2000: Stage post-doctoral à Fort Collins (Colorado, Etat-Unis) puis à l'université de Newcastle-upon-Tyne (Angleterre) sous la direction du Dr. G. S. Besra.

1996-1997 : Stage post-doctoral sous la direction du Dr. C. Locht, INSERM U447, Institut de Biologie de Lille.

4. Encadrement scientifique et composition du groupe

Le groupe que j'encadre et anime au sein du Département de «Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques» correspond actuellement à l'équipe III de l'UMR5235 dirigée par le Pr. Catherine Braun-Breton.

Ce groupe est composé :

- d'un étudiant en thèse (**Paul Gratraud**)
- d'un étudiant indien (**Kanhu Mishra**) réalisant sa thèse à l'Indian Institute of Science (Bangalore, Inde) en co-tutelle avec mon équipe
- un chercheur post-doctoral (**Anuradha Alahari**) financé dans le cadre de l'ATIP du CNRS
- un chercheur post-doctoral (**Adeline Burguière**) recruté sur le projet ANR « Infection et Immunité»
- un chercheur post-doctoral (**Romain Veyron-Churlet**) financé par le New York Community Trust dans le cadre du « Heiser Program for Research in Leprosy and Tuberculosis ».

5. Publications scientifiques (à comité de lecture)

58. L. J. Alderwick, L. G. Dover, N. Veerapen, S. S. Gurcha, **L. Kremer**, D. L. Roper, A. K. Pathak, R. C. Reynolds, and G. S. Besra. 2006. Characterisation of GlfT and the identification of a novel galactosyltransferase Rv3782 involved in priming GlfT-mediated galactan polymerisation in *Mycobacterium tuberculosis*. Soumis.

57. E. Maes, B. Coddeville, **L. Kremer**, and Y. Guérardel. 2007. Polysaccharide structural variability in mycobacteria: Soumis.

56. M. Canova, I. Zanella-Cleon, R. Veyron-Churlet, M. Cohen-Gonsaud, M. Becchi, A. J. Cozzone, **L. Kremer**, and V. Molle. 2007. The Ser/Thr kinase PknL of *Mycobacterium tuberculosis* possesses an original self-activation mechanism to phosphorylate Rv2175c, a putative transcriptional regulator. *Submitted*.

55. E. Ellass, B. Coddeville, Y. Guérardel, **L. Kremer**, E. Maes, J. Mazurier, and D. Legrand. 2007. Identification by surface plasmon resonance of the mycobacterial lipomannan and lipoarabinomannan domains involved in binding to CD14 and LPS-binding protein. *FEBS Lett.* In Press.

54. A. Bhatt, N. Fujiwara, K. Bhatt, S. S. Gurcha, **L. Kremer**, B. Chen, J. Chan, S. Porcelli, K. Kobayashi, G. S. Besra, and W. R. Jacobs, Jr. 2007. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. In Press.

53. L. G. Dover, A. Alahari, P. Gratraud, J. M. Gomes, V. Bhowruth, R. C. Reynolds, G. S. Besra, and **L. Kremer**. 2007. EthA, a common activator of thiocarbamide-containing drugs acting on different mycobacterial targets. *Antimicrobiol. Agents Chemother.* **51**: 1055-1063.

52. S. Sridharan, L. Wang, A. K. Brown, L. G. Dover, **L. Kremer**, G. S. Besra, and J. C. Sacchettini. 2007. X-ray crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl acyl carrier proteins synthase II (*mtKasB*). *J. Mol. Biol.* **366**: 469-480.

51. V. Molle, A. K. Brown, G. S. Besra, A. J. Cozzzone, and **L. Kremer**. 2006. The condensing activities of the *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase are differentially regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**: 30094-30103.
50. C. Vilchèze, F. Wang, M. Arai, M. H. Hazbón, R. Colangeli, **L. Kremer**, T. R. Weisbrod, D. Alland, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs, Jr. 2006. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* elucidates the target of isoniazid. *Nat. Med.* **12**: 1027-1029.
49. V. Molle, N. Saint, S. Campagna, **L. Kremer**, E. Lea, P. Draper, and G. Molle. 2006. pH-dependent pore-forming activity of OmpATb from *Mycobacterium tuberculosis* and characterization of the channel by peptidic dissection. *Mol. Microbiol.* **61**: 826-837.
48. H. R. Morbidoni, C. Vilchèze, **L. Kremer**, R. Bittman, J. C. Sacchettini, and W. R. William, Jr. 2006. Dual inhibition of mycobacterial fatty acid biosynthesis and degradation by 2-alkynoic acids. *Chem. Biol.* **13**: 297-307.
47. L. J. Alderwick, V. Molle, **L. Kremer**, A. J. Cozzzone, T. R. Dafforn, G. S. Besra, and K. Fütterer. 2006. Molecular structure of EmbR, a response element of Ser/Thr kinase signaling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 2558-2563.
46. A. Burguière, P. G. Hitchin, L. G. Dover, **L. Kremer**, M. Ridell, D. C. Alexander, J. Liu, H. R. Morris, D. E. Minnikin, A. Dell, and G. S. Besra. 2005. LosA, a key glycosyltransferase involved in the biosynthesis of a novel family of glycosylated acyltrehalose lipooligosaccharides from *Mycobacterium marinum*. *J. Biol. Chem.* **280**: 42124-42133.
45. A.Ojha, M. Anand, A. Bhatt, **L. Kremer**, W. R. Jacobs, Jr., and G. F. Hatfull. 2005. GroEL1: A dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell.* **123**: 861-873.
44. A. Bhatt, **L. Kremer**, A. Z. Dai, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs, Jr. 2005. Conditional depletion of KasA, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis. *J. Bacteriol.* **187**: 7596-7606.
43. E. Ellass, L. Aubry, M. Masson, A. Denys, Y. Guérardel, E. Maes, D. Legrand, J. Mazurier, and **L. Kremer**. 2005. Mycobacterial lipomannan induces matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in human macrophagic cells through a TLR1/TLR2- and CD14-dependent mechanism. *Infect. Immun.* **73**: 7064-7068.
42. A. K. Brown, S. Sridharan, **L. Kremer**, S. Lindenberg, L. G. Dover, J. C. Sacchettini, and G. S. Besra. 2005. Probing the mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl-ACP synthase III *mtFabH*: factors influencing catalysis and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **280**: 32539-32547.
41. **L. Kremer**, C. de Chastellier, G. Dobson, K. J. C. Gibson, P. Bifani, S. Balor, JP. Gorvel, C. Loch, D. E. Minnikin, and G. S. Besra. 2005. Identification and structural characterization of an unusual mycobacterial monomeromycetyl-diacylglycerol. *Mol. Microbiol.* **57**: 1113-1126.
40. F. Biet, C. Duez, **L. Kremer**, P. Marquillies, L. Amniai, A. B. Tonnel, C. Loch, and J. Pestel. 2005. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing IL-18 reduces IL-5 production and bronchoalveolar eosinophilia induced by an allergic reaction. *Allergy* **60**: 1065-1072.

39. C. Vilchèze, T. R. Weisbrod, B. Chen, **L. Kremer**, M. H. Hazbón, F. Wang, D. Alland, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs, Jr. 2005. Altered NADH/NAD⁺ ratios mediate co-resistance to isoniazid and ethionamide in mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 708-720.
38. S. J. Waddell, R. A. Stabler, K. Laing, **L. Kremer**, R. C. Reynolds, and G. S. Besra. 2004. The use of microarray analysis to determine the gene expression profiles of *Mycobacterium tuberculosis* in response to anti-bacterial compounds. *Tuberculosis.* **84**: 263-274.
37. V. J. Quesniaux, D. M. Nicolle, D. Torres, **L. Kremer**, Y. Guérardel, J. Nigou, G. Puzo, F. Erard, and B. Ryffel. 2004. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent positive and TLR2-independent negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J. Immunol.* **172**: 4425-4434.
36. D. Dao, **L. Kremer**, Y. Guérardel, A. Molano, W.R. Jacobs Jr., S.A. Porcelli, and V. Briken. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and IL-12 production of macrophages. *Infect. Immun.* **72**: 2067-2074.
35. R. A. Wilson, W. N. Maughan, **L. Kremer**, G. S. Besra, and K. Fütterer. 2004. The structure of *Mycobacterium tuberculosis* MPT51 (FbpC1) defines a new family of non-catalytic α/β hydrolases. *J. Mol. Biol.* **335**: 519-530.
34. V. Molle, **L. Kremer**, C. Girard-Blanc, G. S. Besra, A. J. Cozzzone, and J. F. Prost. 2003. A FHA phosphoprotein recognition domain mediates EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr Protein Kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry.* **42**: 15300-15309. **Equal contribution of the two first authors.**
33. R. A. Wilson, S. Rai, W. N. Maughan, **L. Kremer**, B. M. Kariuki, K. D. M. Harris, T. Wagner, G. S. Besra, and K. Fütterer. 2003. Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of *Mycobacterium tuberculosis* FbpC1 (Rv3803c). *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59(Pt12)**: 2303-2305.
32. Y. Guérardel, E., Maes, V., Briken, F., Chirat, Y., Leroy, C., Loch, G., Strecker, and **L. Kremer**. 2003. Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii*: novel structural features and apoptosis-inducing properties. *J. Biol. Chem.* **278**: 36637-36651.
31. V. Molle, C. Girard-Blanc, **L. Kremer**, P. Doublet, A. J. Cozzzone, and J. F. Prost. 2003. Protein PknE, a novel transmembrane eukaryotic-like serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**: 820-825.
30. C. Vignal, Y. Guérardel, **L. Kremer**, M. Masson, D. Legrand, J. Mazurier, and E. Ellass. 2003. Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF- α and IL-8 secretion by a CD14-TLR2 dependent mechanism. *J. Immunol.* **171**: 2014-2023.
29. **L. Kremer**, L. G. Dover, H. R. Morbidoni, C. Vilchèze, W. N. Maughan, A. Baulard, S. C. Tu, N. Honoré, V. Deretic, J. C. Sacchettini, C. Loch, W. R. Jacobs, Jr., and G. S. Besra. 2003. Inhibition of InhA activity, but not KasA activity, induces formation of a KasA-containing complex in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **278**: 20547-20554.

28. F. Biet, **L. Kremer**, I. Wolowczuk, M. Delacre, and C. Locht. 2003. Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.* **71**: 2933-2937.
27. F. Biet, **L. Kremer**, I. Wolowczuk, M. Delacre, and C. Locht. 2002. *Mycobacterium bovis* BCG producing interleukin-18 increases antigen-specific gamma interferon production in mice. *Infect. Immun.* **70**: 6549-6557.
26. M. H. Larsen, C. Vilchèze, **L. Kremer**, G. S. Besra, L. Parsons, M. Salfinger, L. Heifets, M. Hazbon, D. Alland, J. C. Sacchettin, and W. R. Jacobs, Jr. 2002. Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG, and *M. tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **46**: 453-466.
25. **L. Kremer**, Y. Guérardel, S. S. Gurucha, C. Locht, and G. S. Besra. 2002. Temperature-induced changes in the cell-wall components of *Mycobacterium thermoresistibile*. *Microbiology* **148**: 3145-3154.
24. Y. Guérardel, E. Maes, E. Ellass, Y. Leroy, P. Timmerman, G. S. Besra, C. Locht, G. Strecker, and **L. Kremer**. 2002. Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from *Mycobacterium chelonae*: presence of unusual components with alpha 1,3 mannopyranose side chains. *J. Biol. Chem.* **277**: 30635-30648.
23. S. S. Gurucha, A. R. Baulard, **L. Kremer**, C. Locht, D. B. Moody, W. Muhlecker, C. E. Costello, D. C., Crick, P. J. Brennan, and G. S. Besra. 2002. Ppm1, a novel polyprenol monophosphomannose synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **365**: 441-450.
22. **L. Kremer**, L. Dover, S. Carrère, M. Nampoothiri, S. Lesjean, A. K. Brown, P. J. Brennan, D. E. Minnikin, C. Locht, and G. S. Besra. 2002. Mycolic acid biosynthesis and enzymatic characterization of the β -ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **364**: 423-430.
21. **L. Kremer**, S. S. Gurucha, P. Bifani, P. G. Hitchen, A. Baulard, H. R. Morris, A. Dell, P. J. Brennan, and G. S. Besra. 2002. Characterization of a putative α -mannosyltransferase involved in phosphatidylinositol trimannoside biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **363**: 437-447.
20. **L. Kremer**, W. N. Maughan, R. A. Wilson, L. G. Dover and G. S. Besra. 2002. The *M. tuberculosis* antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. *Lett. Appl. Microbiol.* **34**: 233-237.
19. F. Biet, C. Locht, and **L. Kremer**. 2002. Immunoregulatory functions of IL-18 and role in defence against bacterial pathogens. *J. Mol. Med.* **80**: 147-162.
18. **L. Kremer**, K. M. Nampoothiri, S. Lesjeans, L. G. Dover, S. Graham, J. Betts, P. J. Brennan, D. E. Minnikin, C. Locht, and G. S. Besra. 2001. Biochemical characterization of acyl carrier protein (AcpM) and malonyl-CoA:AcpM transacylase (mtFabD), two major components of *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. *J. Biol. Chem.* **276**: 27967-27974.
17. **L. Kremer**, L. Dover, C. Morehouse, P. Hitchin, H. R. Morris, A. Dell, P. J. Brennan, M. R. McNeil, C. Flaherty, and G. S. Besra. 2001. Galactan biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*: identification of a bifunctional UDP-Galactofuranosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **276**: 26430-26440.

16. L. Dupré, **L. Kremer**, I. Wolowczuk, A. Capron, G. Riveau and C. Locht. 2001. Immunostimulatory effect of IL-18-encoding plasmid in DNA vaccination against *Schistosoma mansoni* infection. *Vaccine* **19**: 1373-1380. Erratum in: *Vaccine* **19**: 3606. **Equal contribution of the two first authors.**
15. K-H. Choi, **L. Kremer**, G. S. Besra, and C. O. Rock. 2000. Identification and substrate specificity of b-ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **275**: 28201-28207. **Equal contribution of the two first authors.**
14. O. Billaut-Mulot, T. Idziorek, E. Ban, **L. Kremer**, L. Dupré, M. Loyens, G. Riveau, C. Locht, A. Capron, and G. M. Bahr. 2000. Interleukin-18 modulates immune responses induced by HIV-1 Nef DNA prime/protein boost vaccine. *Vaccine* **19**: 95-102.
13. **L. Kremer**, J. Estaquier, I. Wolowczuk, F. Biet, J. -C. Ameisen, and C. Locht. 2000. Ineffective immune response associated with T-cell apoptosis in susceptible *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect. Immun.* **68**: 4264-4273.
12. **L. Kremer**, J. D. Douglas, A. R. Baulard, C. Morehouse, M. R. Guy, D. Alland, L. G. Dover, J. H. Lakey, W. R. Jacobs, Jr., P. J. Brennan, D. E. Minnikin, and G. S. Besra. 2000. Thiolactomycin and related analogues as novel antimycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **275**: 16857-16864.
11. B. Abomoelak, K. Huygen, **L. Kremer**, M. Turneer, and C. Locht. 1999. Humoral and cellular immune responses in mice immunized with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin producing a pertussis toxin-tatanus toxin hybrid protein. *Infect. Immun.* **67**: 5100-5105.
10. **L. Kremer**, L. Dupré, I. Wolowczuk, and C. Locht. 1999. *In vivo* immunomodulation following intradermal injection with DNA encoding murine IL-18. *J. Immunol.* **163**: 3226-3231.
9. **L. Kremer**, L. Dupré, G. Riveau, A. Capron, and C. Locht. 1998. Systemic and mucosal immune responses after intranasal administration of recombinant BCG expressing a glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*. *Infect. Immun.* **66**: 5669-5676.
8. **L. Kremer**, J. Estaquier, E. Brandt, J. C. Ameisen, and C. Locht. 1997. *Mycobacterium bovis* BCG infection prevents resting human monocytes from apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **27**: 2450-2456.
7. **L. Kremer**, G. Riveau, A. R. Baulard, A. Capron, and C. Locht. 1996. Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant BCG producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *J. Immunol.* **156**: 4309-4317.
6. A. R. Baulard, **L. Kremer**, and C. Locht. 1996. Highly efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria. *J. Bacteriol.* **178**: 3091-3098.
5. A. R. Baulard, **L. Kremer**, P. Supply, D. Vidaud, J. M. Bidart, D. Bellet, and C. Locht. 1996. A new series of mycobacterial expression vectors for the development of live recombinant vaccines. *Gene* **176**: 149-154.
4. **L. Kremer**, A. R. Baulard, J. Estaquier, O. Poulain-Godefroy, and C. Locht, C. 1995. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **17**: 913-922.

3. A. R. Baulard, V. Escuyer, N. Haddad, **L. Kremer**, C. Locht, and P. Berche. 1995. Mercury resistance as a selective marker for recombinant mycobacteria. *Microbiology* **141**: 1045-1050.

2. **L. Kremer**, A. R. Baulard, J. Estaquier, J. Content, A. Capron, and C. Locht. 1995. Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J. Bacteriol.* **177**: 642-653.

1. A. Scheirle, B. Takacs, **L. Kremer**, F. Marin, F. Sinigaglia. 1992. Peptide binding to soluble HLA-DR4 molecules produced by insect cells. *J. Immunol.* **149**: 1994-1999.

6. Chapitres de livres et articles de revue

9. **L. Kremer**, and G. S. Besra. 2004. A waxy tale, by *Mycobacterium tuberculosis*. In: Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. Eds. Cole, S. T., Eisenach, K. D., McMurray, D. N., and Jacobs, W. R., Jr., pp. 287-308, ASM Press, Washington DC.

8. V. Briken, S. A. Porcelli, G. S. Besra, and **L. Kremer**. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol. Microbiol.* **53**: 391-403.

7. **L. Kremer**, and G. S. Besra. 2002. Current status and future development of antitubercular chemotherapy. *Expert Opin. Investig. Drugs* **11**: 1033-1049.

6. **L. Kremer**, L. G. Dover, S. S. Gurcha, A. K. Pathak, R. C. Reynolds, and G. S. Besra. 2002. Recent advances in mycobacterial arabinogalactan biosynthesis in the post-genomic area. Pp 178-185. Royal Society of Chemistry, Carbohydrate Bioengineering, Eds. T.T. Teeri, B. Svensson, H.J. Gilbert and T. Feizi.

5. D. E. Minnikin, **L. Kremer**, L. G. Dover, and G.S. Besra. 2002. The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.* **9**: 545-553.

4. G. S. Besra, and **L. Kremer**. 2002. Re-emergence of tuberculosis: strategies and treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs* **11**: 153-157.

3. **L. Kremer**, A. R. Baulard, and G. S. Besra. Genetics of mycolic acid biosynthesis. 2000. In: G. F. Hatfull, and W. R. Jacobs, Jr., eds. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington D. C. pp. 173-190.

2. **L. Kremer**, and G.S. Besra. 1999. Molecular action of antimycobacterial agents and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Recent Res. Devel. Antimicrob. Agents & Chemother.* **3**: 453-470. Research Signpost eds., Trivandrum, India.

1. **L. Kremer**, G. S. Besra, P. J. Brennan, A. R. Baulard. 1999. Le lipoarabinomannane: structure et fonctions d'un glycolipide impliqué dans la pathogénie tuberculeuse. *Médecine/Sciences* **15**: 842-850.

7. Communications scientifiques

Posters

A. Alahari, L. Dover, R. Reynolds, G. S. Besra, and **L. Kremer**. International Symposium on New Frontiers in Tuberculosis Research, ICGEB Campus, New Delhi, India, December 4-6, 2006. Cell wall mycolic acids as targets of thiocarbamide-containing drugs.

N. Saint, V. Molle, S. Campagna, **L. Kremer**, and G. Molle. 2006. Activité «formeur de pores » en fonction du pH de OmpATb, porine de *Mycobacterium tuberculosis*. Caractérisation du canal par dissection peptidique. 20^{ème} Congrès de la Société Française de Biophysique. 14-19 octobre 2006, Anglet, France.

Y. Guérardel, E. Ellass, E. Maes, and **L. Kremer**, XVIII International Symposium on Glycoconjugates, Florence, Italy, September 4-9, 2005. Mycobacterial lipomanans are major immunomodulators.

K. Ojha, M. Anand, A. Bhatt, **L. Kremer**, W.R. Jacobs, and G.F. Hatfull. International Union of Microbiological Societies, San Francisco, July 23-28, 2005. The non-essential chaperonin, GroEL1, is required for maturation of biofilm in *Mycobacterium smegmatis*.

L. Kremer, C. de Chastellier, G. Dobson, K. J. C. Gibson, P. Bifani, S. Balor, JP. Gorvel, C. Locht, D. E. Minnikin, and G. S. Besra. Gordon Research Conference on Tuberculosis Drug Development, Biddeford, ME, July, 3-8, 2005. Antimycobacterial activity of tetrahydrolipstatin and its effect on lipid bodies distribution.

A. Bhatt, **L. Kremer**, K. Bhatt, A. Z. Dai, and W. R. Jacobs. Gordon Research Conference on Tuberculosis Drug Development, Biddeford, ME, July, 3-8, 2005. Conditional depletion of KasA, a key enzyme in mycolic acid biosynthesis leads to mycobacterial cell lysis.

M. Arai, C. Vilchèze, F. Wang, M. H., Hazbon, R. Colangeli, **L. Kremer**, D. Alland, J. Sacchettini, and W. R., Jacobs. Gordon Research Conference on Tuberculosis Drug Development, Biddeford, ME, July, 3-8, 2005. Definitive determination of the target of isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*.

C. Vilchèze, T. R. Weisbrod, **L. Kremer**, M. Hazbon, and W. R. Jacobs, Jr. 13th International Symposium of the Biology of Actinomycetes, December 2003 1-5, Melbourne, Australia. NADH dehydrogenase mutations alter NADH/NAD⁺ balance in mycobacteria, resulting in isoniazid resistance.

C. Duez, F. Biet, **L. Kremer**, P. Marquillies, C. Locht, A-B. Tonnel, and J. Pestel. Keystone Symposium. Regulation of Mucosal Inflammation, April 1-6, 2003, Keystone, Colorado. An IL-18 secreting BCG vector prevents allergic airway disease in mice.

L. Kremer, L. Dover, A. Brown, J. Betts, M. Nampoothiri, C. Locht, and G. S. Besra. 102nd General Meeting of the ASM, Salt Lake City, May 19-23, 2002. Characterization of new acyl carrier proteins in *M. tuberculosis*.

L. Kremer, L. Dover, S. Carrère, M. Nampoothiri, S. Lesjean, A. Brown, D. Minnikin, C. Locht, and G. S. Besra. 149th Ordinary Meeting of the Society for General Microbiology, University

of East Anglia, Norwich, September 10-13, 2001. Mycolic acid biosynthesis and enzymatic characterization of the KasA condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*.

F. Biet, **L. Kremer**, P. Marquillies, A-B Tonnel, C. Locht, and J. Pestel. Congrès “club cytokine” de la Société française d'Immunologie, Le Croisic, 7-8 juin 2001. Suppression of OVA-dependent eosinophilia by an IL-18 secreting BCG vector.

F. Biet, **L. Kremer**, L. Dupré, I. Wolowczuk, G. Riveau, and C. Locht. 99th General Meeting of the ASM, Chicago, May 30-June 3, 1999. Cytokine profiles and B-cell responses in BCG-susceptible versus BCG-resistant mice infected with *Mycobacterium bovis* BCG producing murine IL-18.

L. Kremer, J. Estaquier, I. Wolowczuk, J. -C. Ameisen, and C. Locht. Keystone Symposia. TB: Molecular and Immunological Aspects, Keystone, Colorado, April 2-8, 1998. Suppression of the cellular immune response in BCG-infected mice is mediated by T cell apoptosis.

L. Kremer, G. Riveau, A. Capron, and C. Locht. ASM meeting on Tuberculosis. Copper Mountain, Colorado, USA. July, 8-12, 1997. Immune response after intranasal administration of a recombinant BCG expressing a glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*.

L. Kremer, J. Estaquier, E. Brandt, J. -C. Ameisen, and C. Locht. 2nd Lille-ULB Meeting. Hôpital Erasme, Bruxelles, January 9, 1997. *Mycobacterium bovis* BCG prevents human monocyte apoptosis.

L. Kremer, J. Estaquier, J. C. Ameisen, and C. Locht. 3rd International Conference on the Pathogenesis of Mycobacterial Infections, Stockholm, Sweden, June 27-30, 1996. *Mycobacterium bovis* BCG prevents human monocyte apoptosis.

B. Abomoelak, **L. Kremer**, A. Baulard, and C. Locht. 96th General Meeting of the ASM, New-Orleans, May 19-23, 1996. Hybrid Bacterial Toxin Expressed in BCG.

L. Kremer, G. Riveau, A. Baulard, A. Capron and C. Locht. 95th General Meeting of the ASM, Washington DC, May 21-25, 1995. Immune response against a schistosomal vaccine antigen obtained after immunization with recombinant BCG.

A. Baulard, **L. Kremer**, J. Estaquier, A. Capron, and C. Locht. 94th General Meeting of the ASM, Las Vegas, May 23-27, 1994. New expression-secretion system suitable for the development of recombinant BCG vaccines.

Communications orales

L. Kremer. 75th Annual Meeting of Society of Biological Chemists India, Jawaharlal Nehru University, New Delhi, India, December 8-11, 2006. Structure and biological properties of mycobacterial lipomanans.

L. Kremer. International Symposium on New Frontiers in Tuberculosis Research, ICGEB Campus, New Delhi, India, December 4-6, 2006. Regulation of condensing activities in *Mycobacterium tuberculosis* Type II Fatty acid Synthase.

L. Kremer. Department of Microbiology and Cell Biology, Indian Institute of Science, Bangalore, India, December 16th, 2004. « β -ketoacyl ACP synthases and mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* : novel therapeutic targets against tuberculosis ? ». Invité par le Dr. Balaji.

L. Kremer. Molecular Biology and Genetics Unit, Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research, Bangalore, India, December 15th, 2004. « β -ketoacyl ACP synthases and mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* : novel therapeutic targets against tuberculosis ? ». Invité par le Pr. N. Surolia.

L. Kremer. CNRS UMR 5539, Université de Montpellier II, June, 30th, 2003. Les β -kétoacyl-ACP synthases dans la biosynthèse des acides mycoliques chez *M. tuberculosis* : de nouvelles cibles thérapeutiques ? Invité par le Dr. H. Vial.

L. Kremer. Institut Transgénose, GEM 2358, CNRS Orléans, March, 4th, 2003. Les β -kétoacyl-ACP synthases et la biosynthèse des acides mycoliques chez *M. tuberculosis*. Invité par le Dr. B. Ryffel.

L. Kremer. Institut Transgénose, GEM 2358, CNRS Orléans, July 3rd, 2002. Le lipoarabinomannane mycobactérien: biosynthèse, structure et fonctions. Invité par le Dr. B. Ryffel.

L. Kremer. Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New-York. May 24, 2002. β -ketoacyl-ACP synthases and mycolic acid biosynthesis in *M. tuberculosis*. Invité par le Pr. W. R. Jacobs, Jr.

L. Kremer. Acid Fast Club Meeting, Edinburgh, 10-11 June, 1999. Targeting β -ketoacyl-ACP synthases in *M. tuberculosis* by thiolactomycin.

L. Dupré, F. Rivenet, **L. Kremer**, I. Wolowczuk, A. -M. Schacht, J. -P. Gazet, A. Capron, and G. Riveau. 5th annual Congress of the British Society for Immunology, Brighton, UK, December, 2-5, 1997. Intradermal DNA immunization: initiation and development of memory immune responses against *Schistosoma mansoni* antigen at the skin level.

L. Kremer. Colorado State University, Colorado, USA. July, 3, 1997. Expression of schistosomal antigens in BCG - Apoptosis of monocytes during BCG infection. Invité par le Pr. P. J. Brennan.

L. Kremer. Institut Pasteur de Paris, June 16, 1997. Expression of schistosomal antigens in BCG. Invité par le Dr. G. Langsley.

L. Kremer. XXVIII^o Rencontre Méribel. Les Arcs, Savoie, March, 23-30, 1997. Mycobacteria/Macrophage interactions.

C. Locht, N. Mielcarek, G. Renaud-Mongénie, **L. Kremer**, G. Riveau, and A. Capron. European Research Conference on Immunology of Infections : oral and other mucosal vaccines. Giens, France, 11-16 October 1996. Attenuated respiratory pathogens as vectors.

8. Collaborations scientifiques

La thématique de l'équipe s'est développée rapidement durant ces dernières années grâce à un réseau de collaboration très actif sur le plan national et international, regroupant à la fois des expertises en chimie organique, en biochimie des lipides et des sucres, en chimie des protéines, en cristallographie, en structure des glycolipides et en immunologie.

Principales collaborations nationales:

- Dr. E. Ellass (Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 8576-CNRS, USTL, Villeneuve d'Ascq)
- Dr. Y. Guérardel (Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 8576-CNRS, USTL, Villeneuve d'Ascq)
- Dr. B. Ryffel (Centre de Transgénose, CNRS, Orléans)
- Dr. P. Herbomel (Unité Macrophages et Développement de l'Immunité, Institut Pasteur, Paris)
- Dr. V. Molle (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS, Lyon)
- Dr. G. Molle (Centre de Biologie Structurale, Montpellier)

Principales collaborations internationales:

- Pr. G. S. Besra (School of Biosciences, Birmingham, UK)
- Pr. D. E. Minnikin (School of Biosciences, Birmingham, UK)
- Dr. K. Fütterer (School of Biosciences, Birmingham, UK)
- Dr. J. C. Sacchettini (Department of Biochemistry and Biophysics, Texas University, College Station, Texas, USA)
- Pr. W. R. Jacobs (Howard Hughes Medical Institute, Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New-York, USA)
- Dr. S. Porcelli (Department of Microbiology and Immunology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, New-York, USA)
- Pr. G. Hatfull (Pittsburgh Bacteriophage Institute, University of Pittsburgh, PA, USA)
- Dr. B. J. Appelmelk (Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam, the Netherlands)

9. Financements

Le groupe que j'ai créé et que j'anime actuellement fonctionne au sein de l'UMR 5235 est soutenu par un programme **ATIP "Microbiologie Fondamentale"** pour une période échelonnée sur trois ans (octobre 2004-octobre 2007) et doté d'une somme de 140 000 € pour la durée totale du projet. La vocation de l'ATIP est de renforcer le dispositif de recherche de l'UMR5235 en s'y insérant totalement, tout en développant de manière autonome sa propre thématique, basée essentiellement sur l'étude et la structure de composants de la paroi chez *M. tuberculosis*. Ce programme a également permis le recrutement d'un chercheur post-doctoral pour une durée de 2 ans.

L'équipe bénéficie également d'autres sources de financement:

-un projet ANR **"Infection et Immunité"** pour la période 2006-2008, dont je suis le coordinateur, et qui associe les équipes du Dr. Y. Guérardel (Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 8576-CNRS, USTL, Villeneuve d'Ascq) et du Dr. P. Herbomel (Unité Macrophages et Développement de l'Immunité, Institut Pasteur, Paris). Le montant total alloué est de 420 000 €, dont 172 000 € versés à mon équipe, ce qui a, entre autre, permis le recrutement d'un chercheur post-doctoral pour une durée de trois ans.

-un projet ANR "Microbiologie, Immunologie et Maladies Emergentes" pour la période 2007-2009, réalisé en partenariat avec le Dr. V. Molle (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, CNRS, Lyon) d'un montant total de 260 000 €, dont 146 000 € attribués à mon équipe.

10. Parcours scientifique, principaux centres d'intérêt et domaines d'expertise.

Ingénieur de formation, je me suis rapidement orienté vers un doctorat. Mon travail de thèse avait pour but le développement d'un vaccin vivant contre la schistosomiase basé sur la mise au point d'un BCG recombinant exprimant un antigène protecteur du parasite *Schistosoma mansoni*. C'est ainsi que je me suis intéressé au BCG et à la mycobactériologie de façon plus générale. Ceci m'a naturellement conduit à poursuivre dans un domaine de recherche fondamentale en plein essor sous la forme de plusieurs stages post-doctoraux, d'abord en France puis à l'étranger. Le dénominateur commun de ces études a consisté à mieux comprendre la biosynthèse des composants majeurs de la paroi (notamment de nature lipidique ou glycolipidique) chez *Mycobacterium tuberculosis* et leur rôle dans la virulence mycobactérienne. Ces composants de paroi participent à divers aspects de la physiopathologie tuberculeuse. Les enzymes impliquées dans leur synthèse sont donc susceptibles de conduire à des approches thérapeutiques autant d'un point de vue pharmacologique (inhibiteurs) que vaccinal (souches mycobactériennes atténuées, vaccins sous-unitaires). Les résultats que j'ai obtenus ainsi que le réseau de collaborations que j'ai mis en place m'ont incité à poursuivre mes recherches en mycobactériologie en tant que Chargé de Recherche INSERM, tout d'abord à l'Institut de Biologie de Lille et depuis trois ans à l'UMR 5235 à Montpellier. C'est donc à Montpellier que j'ai créé mon équipe pour y développer cette thématique, hautement compétitive sur le plan national et international.

Mes domaines d'expertise gravitant autour de la biologie moléculaire et de la biochimie des lipides chez les mycobactéries, l'ensemble du projet se situe à l'interface entre plusieurs disciplines, nécessitant de multiples compétences dans des domaines aussi variés que la chimie, la biologie structurale ou l'immunologie. De nombreuses collaborations nationales et internationales ont donc été établies dans ce sens pour assurer la progression et le développement continu de ces études.

Je suis également régulièrement sollicité en tant que "reviewer" pour divers journaux scientifiques internationaux tels que *Vaccine*, *Infection & Immunity*, *Microbiology*, *Journal of Bacteriology*, *Molecular Microbiology*, *Journal of Biological Chemistry*, *EMBO Journal*, *PNAS*.

*Analyse des Travaux de Recherche antérieurs
(1992-2006)*

Ce document résume les étapes et les principaux résultats de ma carrière scientifique. Les résultats les plus récents, qui constituent la base de mon projet de recherche, y seront davantage développés.

1. Période 1992/1995

Travail de Thèse, sous la direction du Pr. André Capron, INSERM U167, Institut Pasteur de Lille

"Développement d'un BCG recombinant exprimant la glutathion S-transférase de Schistosoma mansoni dans le cadre d'une stratégie vaccinale contre la schistosomiase"

La bilharziose, ou schistosomiase, causée par *Schistosoma mansoni*, représente actuellement la deuxième endémie parasitaire au monde après le paludisme. Dans le but de réduire la pathologie et de limiter la transmission de la maladie, une protéine de 28 kDa produite par *S. mansoni* et possédant une activité glutathion-S-transférase (Sm28GST) a été identifiée et constitue un candidat vaccinal prometteur.

Dans le cadre d'une démarche destinée à augmenter les potentialités vaccinales de la Sm28GST contre la bilharziose, mon travail de thèse a consisté à développer un BCG (Bacille Calmette-Guérin) recombinant exprimant la Sm28GST. Le BCG offre en effet de multiples avantages en tant que vecteur vaccinal. Il représente à l'heure actuelle le vaccin le plus administré chez l'homme, avec un taux d'effets secondaires relativement faible. Il peut être administré dès la naissance et engendre une immunité durable pendant plusieurs années. Par ailleurs, il constitue un puissant adjuvant. J'ai tout d'abord étudié et analysé la région promotrice de l'antigène 85A (un produit majeur de sécrétion chez *Mycobacterium tuberculosis*) que nous avons alors utilisé pour exprimer et sécréter la Sm28GST chez le BCG. Cette souche recombinante est capable d'induire chez les souris une réponse cellulaire spécifique mais de faible intensité contre la Sm28GST. Par contre, des souris immunisées par voie intrapéritonéale avec un BCG exprimant la Sm28GST sous forme cytoplasmique (sous contrôle du promoteur *hsp60* de BCG) développent une importante réponse humorale anti-Sm28GST. De plus, nous avons mis en évidence la présence d'anticorps inhibant l'activité enzymatique de la Sm28GST, une particularité corrélée à une réduction de la fécondité des vers et de la viabilité des œufs. Par ailleurs, une administration intranasale de la souche s'accompagnait également d'une importante réponse mucoale spécifique.

L. Kremer, A. R. Baulard, J. Estaquier, J. Content, A. Capron, and C. Locht. 1995. Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J. Bacteriol.* **177**: 642-653.

L. Kremer, G. Riveau, A. R. Baulard, A. Capron, and C. Locht. 1996. Neutralizing antibody responses elicited in mice immunized with recombinant BCG producing the *Schistosoma mansoni* glutathione S-transferase. *J. Immunol.* **156**: 4309-4317.

Les gènes conférant la résistance aux antibiotiques sont fréquemment utilisés pour sélectionner et maintenir le plasmide au sein de la bactérie. Malheureusement, l'usage de tels gènes n'est pas compatible avec la vaccination chez l'homme. Afin de contourner ce problème, nous avons développé un système de sélection basé sur la résistance aux composés mercuriels.

R. Baulard, V. Escuyer, N. Haddad, **L. Kremer**, C. Locht, and P. Berche. 1995. Mercury resistance as a selective marker for recombinant mycobacteria. *Microbiology* **141**: 1045-1050.

Nous avons également développé un nouvel outil génétique, et montré pour la première fois, l'intérêt d'utiliser la GFP chez un procaryote. La mise au point d'un BCG exprimant la GFP nous a permis, entre autres, de visualiser aisément les mycobactéries fluorescentes au sein des macrophages infectés ou dans des organes de souris infectées.

L. Kremer, A. R. Baulard, J. Estaquier, O. Poulain-Godefroy, and C. Locht, C. 1995. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* **17**: 913-922

Enfin, dans le but d'éviter la perte du plasmide porté par le BCG recombinant dans l'organisme immunisé, nous avons développé un outil génétique permettant la stabilisation de l'information exogène dans le chromosome du BCG par recombinaison homologue. Ainsi, l'intégration intrachromosomique d'un fragment d'ADN ne nécessite plus l'utilisation d'une pression de sélection continue. Cette méthodologie ouvre également la voie sur l'interruption de gènes mycobactériens, une technique particulièrement efficace pour déterminer la fonctions de certaines protéines.

A. R. Baulard, **L. Kremer**, and C. Locht. 1996. Highly efficient homologous recombination in fast-growing and slow-growing mycobacteria. *J. Bacteriol.* **178**: 3091-3098.

2. Période 1996/2000

Séjours post-doctoraux

• **Equipe du Dr. Camille Locht, INSERM U447, Institut de Biologie de Lille (1996-1998)**

• **Equipe du Pr. Gurdyal Besra tout d'abord à Fort Collins (Colorado State University, Colorado, Etat-Unis) puis à l'Université de Newcastle-upon-Tyne (Angleterre) (1998-2000)**

"Biosynthèse, structure et fonctions de composants majeurs de la paroi chez Mycobacterium tuberculosis"

Mycobacterium tuberculosis, l'agent étiologique de la tuberculose, est responsable de la première cause de mortalité liée à un agent infectieux unique. Depuis le milieu des années 80, le monde connaît une augmentation alarmante de cette maladie avec une incidence de mortalité d'environ 3 millions de décès par an (Dye, 2006). Cette recrudescence est essentiellement liée à la pandémie du SIDA, à la détérioration des conditions socio-économiques et à l'apparition de souches présentant de multiples résistances aux antibiotiques. Ceci est d'autant plus inquiétant que l'effet protecteur moyen du Bacille de Calmette-Guérin (BCG) contre la tuberculose n'est que de 50% (Colditz *et al.*, 1994). Ainsi, le développement de nouveaux antibiotiques dirigés contre les infections mycobactériennes constitue une priorité.

M. tuberculosis est un parasite intracellulaire facultatif. Un des aspects-clés de la virulence de cette mycobactérie réside dans sa capacité à survivre et à se répliquer dans la cellule hôte phagocytaire qui constitue, pour la plupart des autres microorganismes, un environnement extrêmement hostile. Les interactions hôte-pathogène nécessaires à cette infection requièrent des molécules associées à la paroi mycobactérienne, incluant les acides mycoliques et le lipoarabinomannane (LAM). Par ailleurs, certains constituants de la paroi représentent des cibles

pour de nombreuses molécules antituberculeuses couramment utilisées tel que l'isoniazide (INH). Ainsi, l'identification des voies de synthèse de ces composants de paroi pourrait non seulement mener à une meilleure compréhension de la pathogénie tuberculeuse, mais aboutir au développement de nouvelles thérapies antimycobactériennes. Nous avons donc voulu identifier, caractériser et étudier les gènes impliqués dans la synthèse des acides mycoliques et du LAM, et déterminer la structure de ces composés dans différentes espèces mycobactériennes.

2.1 Généralités sur la paroi mycobactérienne et les acides mycoliques

Le modèle actuel d'architecture de l'enveloppe mycobactérienne souligne la présence d'une importante barrière lipidique à l'extérieur de la cellule qui est composée d'une part des longues chaînes lipidiques des acides mycoliques, et d'autre part d'un assortiment de lipides libres plus courts, tels le mycocérosate, les glycolipides phénoliques et différents phospholipides (Brennan and Nikaido, 1995). De plus, une série de polysaccharides et de glycolipides inhabituels, tels que le les phosphatidyl-inositol mannosides (PIMs), le lipomannane (LM) et le lipoarabinomannane (LAM) sont associés à la partie externe de la paroi. On estime que l'ensemble de ces lipides représente pas moins de 60% du poids sec de la paroi. Les mycolates sont reliés de manière covalente au peptidoglycane par l'intermédiaire d'une structure polysaccharidique appelée arabinogalactane (AG). La paroi présente donc une structure unique de type mycolyl-arabinogalactane-peptidoglycane (Fig. 1).

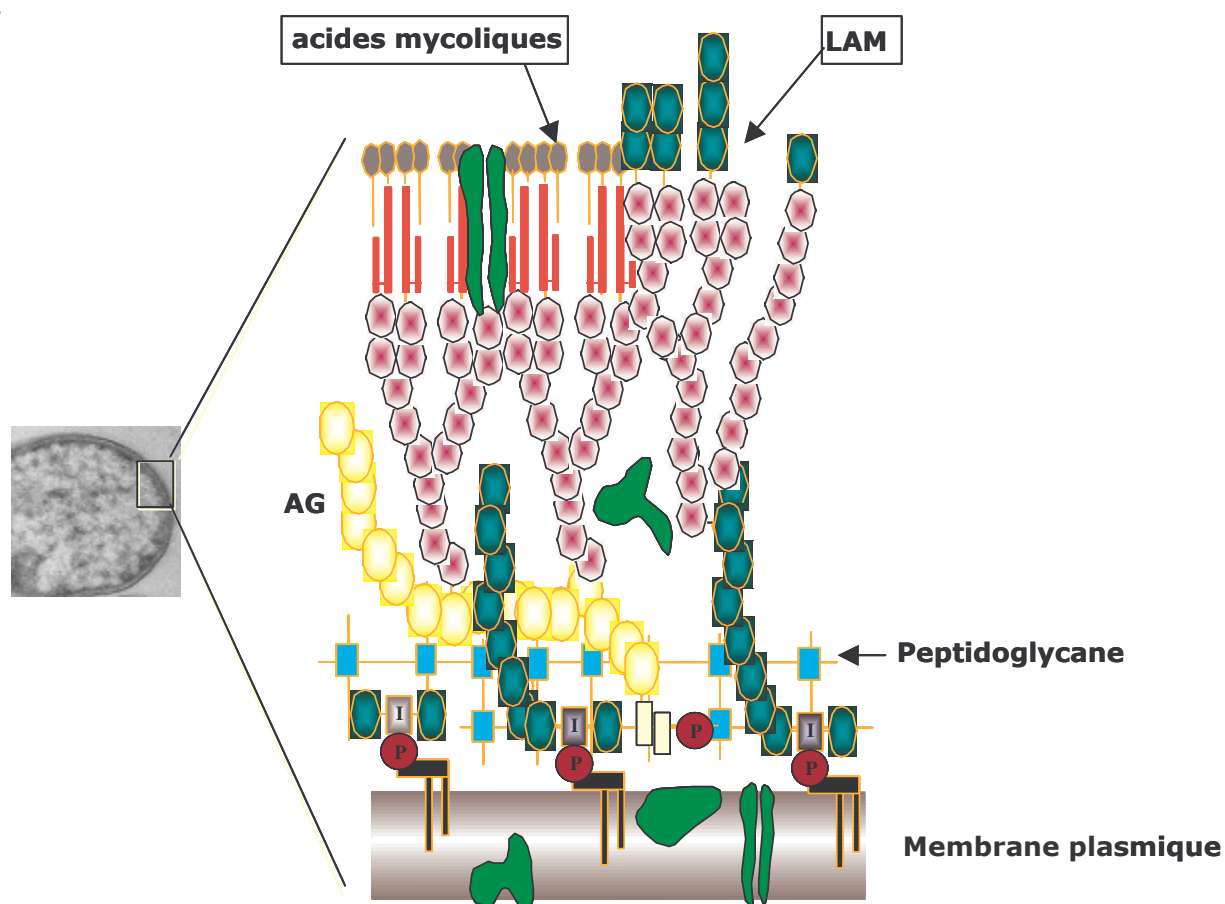
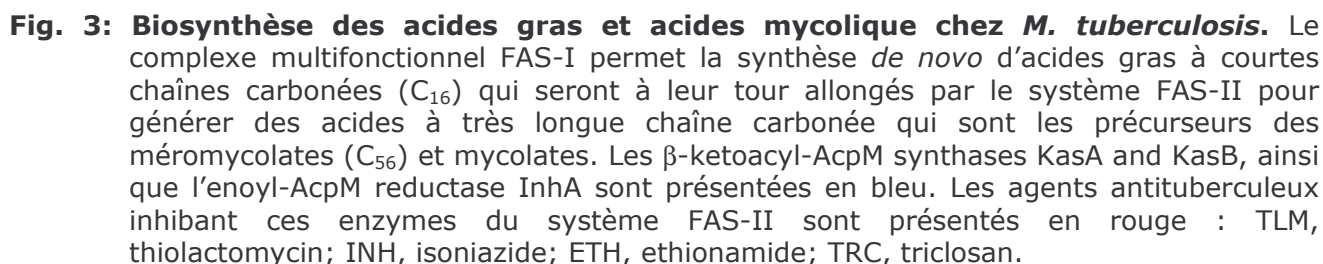


Fig. 1: Structure de l'enveloppe de *M. tuberculosis*

Les acides mycoliques sont des acides gras de type α -alkyl- β -hydroxy possédant une structure propre aux mycobactéries (Fig. 2). Ils sont composés de deux chaînes d'acides gras, l'acide méromycolique constitué d'environ 56 atomes de carbone et la branche α constituée de 26 atomes de carbone. Bien que la structure de base des acides mycoliques semble bien conservée au sein du genre



Les acides mycoliques sont issus de la succession de cycles d'élongation catalysés par un énorme complexe multiprotéique appelé FAS-I pour “ type I Fatty Acid System ”. FAS-I est capable de générer des chaînes d'acyl-CoA à courtes chaînes carbonées qui sont à leur tour converties sous la forme d'acyl-Acyl Carrier Protein (ACP), lesquels sont ensuite allongés grâce au système FAS-II pour “ type II Fatty Acid System ”. FAS-II, à la différence de FAS-I, consiste en un ensemble dissocié d'activités enzymatiques agissant de manière cyclique et répétitive pour aboutir à la synthèse d'acides méromycoliques, les précurseurs directs des acides mycoliques (Fig. 3).



L. Kremer, A. R. Baulard, and G. S. Besra. Genetics of mycolic acid biosynthesis. 2000. In: G. F. Hatfull, and W. R. Jacobs, Jr., eds. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington D. C. pp. 173-190.

2.2.1. Identification et caractérisation du lien enzymatique entre FAS-I et FAS-II

Chez les bactéries, l'étape d'élongation du système FAS-II est initiée par une condensation entre l'acétyl-CoA et le malonyl-ACP, une réaction catalysée par la β -kétol-ACP synthase III (FabH). Chez *M. tuberculosis* H37Rv, le produit du gène Rv0533c présente une identité de 37 % avec cette protéine FabH. Nous avons cloné le gène Rv0533c (*mtfabH*) puis exprimé et purifié la protéine recombinante chez *E. coli*. L'étude enzymatique de mtFabH a révélé un point fondamental, à savoir sa **préférence pour de longues chaînes d'acyl-CoA** plutôt que des substrats de type acyl-ACP. En effet, le lauroyl-CoA (C₁₂-CoA) et le myristoyl-CoA (C₁₄-CoA) constituent les deux substrats préférés de mtFabH, qui sont alors convertis en myristoyl-ACP et palmitoyl-ACP (C₁₆-ACP), respectivement. Ces données suggèrent que mtFabH représente **le lien enzymatique entre les systèmes d'élongation FAS-I et FAS-II** chez *M. tuberculosis* (Fig. 3). Par conséquent, mtFabH pourrait constituer donc une cible attractive pour le développement de nouvelles molécules antituberculeuses.

K-H. Choi, L. Kremer, G. S. Besra, and C. O. Rock. 2000. Identification and substrate specificity of β -ketoacyl (acyl carrier protein) synthase III (mtFabH) from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **275**: 28201-28207. **Contribution égale des deux premiers auteurs.**

Afin de mieux comprendre le mécanisme enzymatique catalysé par mtFabH, nous avons initié une collaboration avec l'équipe du Dr. J. Sacchettini (Department of Biochemistry and Biophysics, Texas University, College Station, Texas, USA) qui a récemment déterminé la structure tridimensionnelle de mtFabH.

A. K. Brown, S. Sridharan, L. Kremer, S. Lindenberg, L. G. Dover, J. C. Sacchettini, and G. S. Besra. 2005. Probing the mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl-ACP synthase III mtFabH: factors influencing catalysis and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **280**: 32539-3254.

2.2.2 L'acyl Carrier Protein (AcpM) et la malonyl-CoA:AcpM transacylase

La malonyl-CoA:ACP transacylase (MCAT) est une enzyme essentielle de la biosynthèse des acides gras chez toutes les bactéries. Elle catalyse la réaction de transacylation du malonate provenant du malonyl-CoA avec de l'ACP, générant du malonyl-ACP qui constitue l'unité d'élongation de la chaîne d'acide gras en cours de croissance. Cependant, cette réaction n'a lieu que si la forme inactive d'apo-ACP est convertie en holo-ACP par le transfert d'un groupement 4'-phosphopantéthéine provenant du CoA. Le terme "ACP" fait référence à l'Acyl Carrier Protein de *E. coli*, tandis que "AcpM" représente le transporteur lipidique spécifique chez les mycobactéries. Afin de mieux comprendre le rôle physiologique de AcpM et de la MCAT dans la biosynthèse des acides mycoliques, nous avons cloné les gènes *acpM* et *mtfabD* de *M. tuberculosis* afin d'exprimer et de purifier leurs produits de traduction.

Ces deux gènes appartiennent au même opéron que les gènes *kasA* et *kasB* impliqués dans l'élongation du méromycolate (voir paragraphe 2.3.2). Chez *E. coli*, l'expression d'AcpM donne naissance à trois formes distinctes. L'analyse par spectrométrie de masse a montré la présence des formes apo-AcpM, holo-AcpM, et palmitoyl-AcpM. Le gène *mtfabD* de *M. tuberculosis* catalyse une réaction de trans-malonylation puisqu'il est capable de compléter *in vivo* un mutant *fabD* de *E. coli*. Par ailleurs, la purification de mtFabD résulte en une protéine active exprimant une forte activité MCAT *in vitro*. MtFabD est donc l'enzyme clé nécessaire à la synthèse de malonyl-AcpM, qui constitue l'unité de base requise pour l'élongation du méromycolate par FAS-II (Fig. 3).

Dans le but d'étudier les relations structure-fonction de mtFabD, une série de protéines mutantes ont été générées. Les diverses mutations Q9A, R116A, Q243A, S91T et S91A

s'accompagnent toutes d'une perte totale de l'activité MCAT, soulignant l'importance de ces différents résidus dans la catalyse et/ou le maintien d'une structure tri-dimensionnelle stable.

L. Kremer, K. M. Nampoothiri, S. Lesjeans, L. G. Dover, S. Graham, J. Betts, P. J. Brennan, D. E. Minnikin, C. Loch, and G. S. Besra. 2001. Biochemical characterization of acyl carrier protein (AcpM) and malonyl-CoA:AcpM transacylase (mtFabD), two major components of *Mycobacterium tuberculosis* fatty acid synthase II. *J. Biol. Chem.* **276**: 27967-27974.

2.2.3 Caractérisation enzymatique de KasA et élongation du méromycolate

Après la synthèse de malonyl-ACP par mtFabD, le processus d'élongation des chaînes d'acides gras résulte de la condensation entre une unité à deux carbones provenant du malonyl-ACP et l'acyl-ACP en cours de croissance. Cette étape clé est catalysée par des β -kétolacyl-ACP synthases codées par les gènes *kasA* et *kasB*. Dans le but de caractériser la protéine KasA et d'étudier sa fonction précise dans la biosynthèse des acides mycoliques, nous avons surexprimé le gène *kasA* dans *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium chelonae* et étudié l'effet de la surexpression sur la composition en acides mycoliques dans ces deux souches. Cette étude a clairement montré que *kasA* code une enzyme capable d'allonger le méromycolate *in vivo*. Nous avons également démontré *in vitro* que KasA fait partie intégrante du système FAS-II, et utilise principalement le palmitoyl-ACP comme substrat de départ. Par ailleurs, la protéine recombinante purifiée catalyse une réaction de condensation *in vitro* en présence de palmitoyl-AcpM et malonyl-AcpM, confirmant que KasA est une β -kétolacyl-ACP synthase. La mutagenèse dirigée des résidus Cys171, His311, Lys340 et His345 a révélé l'importance de ces acides aminés dans cette catalyse enzymatique. Enfin, la protéine purifiée KasA est sensible à la céruléine, connue comme un inhibiteur des β -kétolacyl-ACP synthases chez *E. coli*.

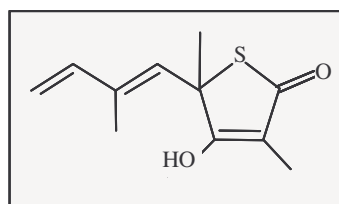
L. Kremer, L. Dover, S. Carrère, M. Nampoothiri, S. Lesjean, A. K. Brown, P. J. Brennan, D. E. Minnikin, C. Loch, and G. S. Besra. 2002. Mycolic acid biosynthesis and enzymatic characterization of the β -kétolacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **364**: 423-430.

2.3 Etude de nouveaux inhibiteurs de la biosynthèse des acides mycoliques

2.3.1 Activité antimycobactérienne de la thiolactomycine et de ses dérivés

La thiolactomycine ou TLM (Fig. 4) est une molécule isolée à partir de surnageant de culture de *Nocardia*. Cet antibiotique est actif *in vitro* contre diverses espèces Gram-positives ou Gram-négatives en inhibant la synthèse des acides gras (Hayashi *et al.*, 1983). Il a aussi été montré que la TLM constitue également un puissant antituberculeux *in vitro* et *in vivo*, en inhibant à la fois la synthèse des acides gras et des acides mycoliques de la paroi (Slayden *et al.*, 1996).

Fig. 4 : Structure chimique de la thiolactomycine (TLM)



Nous avons montré que la TLM inhibe également divers isolats cliniques de *M. tuberculosis* et, de manière totalement inattendue, constaté qu'une souche, multi-résistante à cinq différents antituberculeux, présentait une hypersensibilité à la TLM (concentration minimale inhibitrice (CMI) < 10 μ g/ml) par rapport aux souches contrôle (CMI = 20-40 μ g/ml). La TLM représente ainsi une molécule attractive pour le traitement de tuberculoses causées par des souches multi-résistantes. Ces résultats nous ont conduit à synthétiser une série d'analogues structuraux de la TLM, plus stables chimiquement, en collaboration avec l'équipe du Pr. David Minnikin (School of Biosciences, University of Birmingham, UK). L'activité de ces composés a été évaluée *in vivo* contre

M. tuberculosis, ce qui a permis de montrer que certains analogues sont 5 fois plus efficaces que la TLM elle-même.

L. Kremer, and G.S. Besra. 1999. Molecular action of antimycobacterial agents and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Recent Res. Devel. Antimicrob. Agents & Chemother.* **3**: 453-470. Research Signpost eds., Trivandrum, India.

2.3.2 La TLM, un inhibiteur des β -kétolacyl-AcpM synthases KasA et KasB

L'importante activité antimycobactérienne de la TLM et de ses analogues structuraux nous a encouragé à identifier sa (ses) cible(s) moléculaire(s) chez *M. tuberculosis*.

Chez *E. coli*, la TLM inhibe des enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides, en particulier des β -kétolacyl-ACP synthétases. Ces enzymes catalysent les réactions d'élongation des chaînes d'acides gras par condensation d'un groupement acyl lié à l'"acyl carrier protein" (ACP) avec du malonyl-ACP. Chez *M. tuberculosis*, nous avons identifié par comparaison de séquence KasA et KasB, deux protéines présentant 33% d'identité avec les Kas de *E. coli*. Les gènes *kasA* et *kasB* appartiennent tous deux au même opéron que *acpM* et *mtfabD*, et représentent des cibles potentielles de la TLM. Ainsi, dans le but d'étudier KasA et KasB de *M. tuberculosis*, nous avons tout d'abord surexprimé ces derniers chez *M. bovis* BCG.

Alors que la CMI pour la TLM de la souche BCG contrôle avoisinait les 30 $\mu\text{g/ml}$, les CMI des souches surexprimant soit KasA soit KasB étaient de 80 et 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivement. La coexpression de KasA et KasB conduisait à un effet additif avec une CMI = 150-200 $\mu\text{g/ml}$. Ainsi, la surexpression de KasA et/ou KasB augmente la résistance du BCG à la TLM, indiquant que les deux enzymes constituent des cibles primaires de la TLM. Par ailleurs, l'analyse du profil lipidique par chromatographie en couche mince (CCM) de mycobactéries cultivées en présence de ^{14}C -acétate et de TLM indique une moindre inhibition de la synthèse des acides gras et des acides mycoliques chez le clone surexprimant KasA. Ceci suggère bien que KasA est impliqué dans la biosynthèse des acides mycoliques chez les mycobactéries et constitue une cible majeure de la TLM. De plus, la présence de TLM s'accompagne de profonds changements morphologiques des colonies de BCG contrôle alors que la souche recombinante ne montre aucune altération morphologique visible, même en présence de fortes doses de TLM.

L. Kremer, J. D. Douglas, A. R. Baulard, C. Morehouse, M. R. Guy, D. Alland, L. G. Dover, J. H. Lakey, W. R. Jacobs, Jr., P. J. Brennan, D. E. Minnikin, and G. S. Besra. 2000. Thiolactomycin and related analogues as novel antimycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **275**: 16857-16864.

2.4. Etudes des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse du LAM

Le lipoarabinomannane ou LAM est un lipopolysaccharide complexe qui présente une vaste panoplie de fonctions biologiques et peut être considéré comme le "LPS" mycobactérien (Nigou *et al.*, 2003). Il s'intercale de manière non covalente dans l'enchevêtrement complexe formé par l'arabinogalactane, les acides mycoliques et le peptidoglycane (Fig. 1). Maintes études ont démontré son implication dans de nombreux processus physiologiques relatifs à la pathogénie tuberculeuse. En effet, il est impliqué dans l'atténuation de la réponse immune de l'hôte ainsi que dans l'adhérence et l'internalisation du bacille dans les macrophages. Le LAM constitue ainsi un facteur de virulence majeur et représente dès lors une cible thérapeutique intéressante pour le développement de nouveaux composés antituberculeux.

Ce lipoglycane est hétérogène en taille mais aussi quant à la structure de ses branchements et à son degré d'acylation. Il est composé de deux domaines glucidiques, respectivement polymères de résidus mannose et arabinose, et d'un domaine lipidique d'ancrage de la macromolécule dans la membrane plasmique (Fig. 5). La structure d'ancrage est constituée d'un groupement phosphatidyl-inositol (PI). Les deux acides gras branchés sur le glycérol sont de nature variable, cependant les

acides palmitique et tuberculostéarique sont les lipides les plus couramment rencontrés. Le premier domaine glucidique est composé de résidus mannose, séquentiellement ajoutés par polymérisation $\alpha(1\rightarrow6)$, donnant naissance à une série de glycolipides de taille variable baptisés phosphatidylinositol-mannosides (PIMs, où « s » représente le nombre de résidus mannose). Au cours de cette élongation un groupement mannose est branché en position C₂ de certains résidus du tronc mannane, engendrant ainsi des molécules appelées lipomannane (LM). Le LAM dérive du LM par l'adjonction du second domaine saccharidique, un polymère très ramifié de résidus arabinoses. Le corps du polymère est une succession de résidus arabinose liés en $\alpha(1\rightarrow5)$.

L'identification des glycosyltransférases impliquées dans la biogenèse des phosphatidylinositol mannosides (PIMs), connus comme étant des précurseurs directs du LAM, devrait permettre de mieux connaître la voie de biosynthèse de ce glycolipide complexe. Par ailleurs, l'inactivation des gènes correspondants chez les mycobactéries devrait permettre de préciser le rôle du LAM dans la pathogénèse et ses interactions avec la cellule hôte. Nous avons ainsi **identifié et caractérisé un gène, *pimC***, codant une α -mannosyltransférase de *M. tuberculosis* CDC 1551 qui catalyse la formation de PIM₃ à partir de GDP-mannose et de PIM₂. Cependant, l'inactivation de *pimC* chez le BCG n'affecte ni la production des PIMs ni du LAM, suggérant l'existence de gènes redondants ou de mécanismes compensatoires chez le BCG. Une analyse précise de la distribution de *pimC* dans un grand nombre d'isolats cliniques de *M. tuberculosis* a révélé la présence de ce gène dans seulement 22% des souches. La localisation génétique de *pimC* montre que celui-ci est présent dans une région bordée de deux *IS6110*. Ainsi, la perte de ce locus dans un grand nombre d'isolats cliniques résulterait très vraisemblablement d'un événement de double recombinaison homologue entre les deux *IS6110*.

L. Kremer, G. S. Besra, P. J. Brennan, A. R. Baulard. 1999. Le lipoarabinomannane: structure et fonctions d'un glycolipide impliqué dans la pathogénie tuberculeuse. *Médecine/Sciences* **15**: 842-850.

L. Kremer, L. Dover, S. Carrère, M. Nampoothiri, S. Lesjean, A. K. Brown, P. J. Brennan, D. E. Minnikin, C. Loch, and G. S. Besra. 2002. Mycolic acid biosynthesis and enzymatic characterization of the β -ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **364**: 423-430.

3. Période 2000/2003

Chargé de Recherche (CR2) dans l'Unité INSERM U447, Equipe du Dr. Camille Loch, Institut de Biologie de Lille

"Pathogénie tuberculeuse et nouvelles cibles thérapeutiques : biosynthèse, structure et fonctions biologiques des acides mycoliques et du lipoarabinomannane chez M. tuberculosis"

3.1 Détermination de la structure des LAMs chez diverses espèces mycobactériennes

Les données structurales du LAM provenant d'un nombre très limité d'espèces mycobactériennes (*M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* et *M. smegmatis*), nous avons déterminé la structure des LAMs provenant de différentes espèces mycobactériennes; ceci dans le but d'apporter des éléments nouveaux quant aux relations structure-fonction de ce lipoglycane.

En collaboration avec l'équipe du Dr. Y. Guérardel (Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 8576-CNRS, USTL, Villeneuve d'Ascq), nous avons élucidé la structure fine du LAM de *Mycobacterium chelonae*, une mycobactérie pathogène opportuniste à croissance rapide

naturellement résistante à de nombreux antibiotiques. Chez un individu immunocompétent, l'infection peut se traduire par des lésions cutanées localisées, des lésions oculaires et des lymphoadénopathies. Nous avons ainsi montré que le LAM de *M. chelonae*, baptisé CheLAM, est le représentant d'une nouvelle sous-famille de LAM (AraLAM) puisqu'il est sensiblement différent des structures déjà connues (Fig. 5). En effet, chez *M. tuberculosis*, la partie mannane du LAM résulte de polymérisation linéaire séquentielle d'unités mannose $\alpha(1\rightarrow6)$. Elle est branchée en $\alpha(1\rightarrow2)$ par des résidus mannose selon un degré variable d'espèce à espèce. Chez *M. chelonae*, tous les mannoses du tronc mannane sont branchés par une liaison glycosidique de type $\alpha(1\rightarrow3)$. Ceci suggère donc que la structure du mannane du CheLAM, de part sont degré de substitution et de la nature même de ses liaisons mannosidiques, n'est pas conservée au sein des différentes espèces mycobactériennes, comme il a été rapporté dans la littérature. Les autres différences résident dans l'extrême variabilité des acides gras composants l'ancre phosphatidylinositol et surtout dans l'absence de coiffes sur la partie arabinane du LAM. De la même façon, nous avons élucidé la structure du LM/LAM de *M. kansasii*, un pathogène humain dont la prévalence est en augmentation (Alcaide *et al.*, 1997), particulièrement chez les patients atteints de SIDA. Le LAM de *M. kansasii* possède une coiffe de mannose, tout comme celui de *M. tuberculosis*. Nous disposons ainsi toute une panoplie de LMs et LAMs (issus de *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*) présentant des structures variées (Fig. 5), constituant des outils de choix pour des études de type structure-fonction ainsi que pour étudier/comparer leurs effets dans divers systèmes biologiques.

Y. Guérardel, E. Maes, E. Ellass, Y. Leroy, P. Timmerman, G. S. Besra, C. Loch, G. Strecker, and L. Kremer. 2002. Structural study of lipomannan and lipoarabinomannan from *Mycobacterium chelonae*: presence of unusual components with alpha 1,3 mannopyranose side chains. *J. Biol. Chem.* **277**: 30635-30648.

Y. Guérardel, E., Maes, V., Briken, F., Chirat, Y., Leroy, C., Loch, G., Strecker, and L. Kremer. 2003. Lipomannan and lipoarabinomannan from a clinical isolate of *Mycobacterium kansasii*: novel structural features and apoptosis-inducing properties. *J. Biol. Chem.* **278**: 36637-36651.

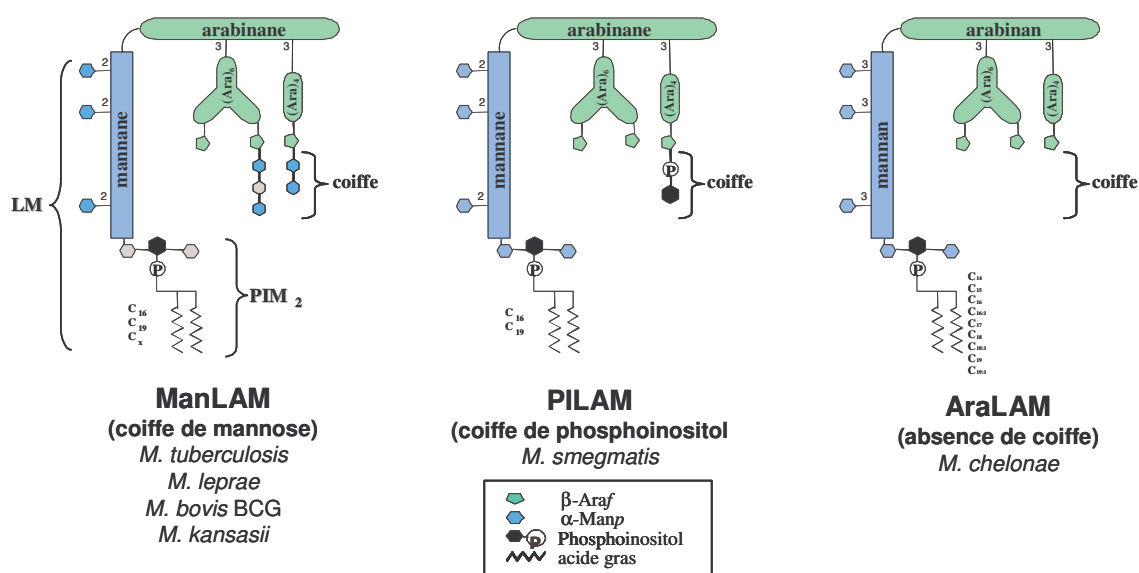


Fig. 5: Structures schématiques des 3 grandes familles de LAM.

3.2 Etude *in vitro* des fonctions immunomodulatrices des LMs/LAMs

La possibilité de disposer d'un nombre relativement important de LMs/LAMs structuralement bien définis nous a permis de tester et de comparer leur capacité à induire l'expression de certaines cytokines sur des macrophages murins et humains. Des résultats obtenus en collaboration avec l'équipe du Dr E. Ellass (Laboratoire de Chimie Biologique, UMR 8576-CNRS, USTL, Villeneuve

d'Ascq) on montré que le LM, mais pas le LAM, induit d'importantes quantités de TNF- α et d'IL-8 chez le macrophage, suggérant que le LM constitue un nouveau facteur pro-inflammatoire. Nous avons également démontré que le LM est donc biologiquement actif et que le domaine arabinane du LAM crée un encombrement stérique important qui empêcherait l'induction d'un signal déclenchant l'expression de cytokines pro-inflammatoires.

C. Vignal, Y. Guérardel, **L. Kremer**, M. Masson, D. Legrand, J. Mazurier, and E. Ellass. 2003. Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF- α and IL-8 secretion by a CD14-TLR2 dependent mechanism. *J. Immunol.* **171**: 2014-2023.

Par ailleurs la réponse pro-inflammatoire induite par le LM est dépendante de TLR2 mais pas de TLR4, ce que nous avons démontré, en collaboration avec l'équipe du Dr. B. Ryffel (Centre de Transgénose, Orléans), grâce à l'utilisation de macrophages issus de souris TLR2^{-/-} et TLR4^{-/-}. De plus, une collaboration avec le Dr. V. Briken (University of Maryland, Baltimore, MD) a permis de montrer que le LM, à la différence du LAM, induit l'expression d'IL-12 ainsi qu'une forte réponse apoptotique chez le macrophage.

V. J. Quesniaux, D. M. Nicolle, D. Torres, **L. Kremer**, Y. Guérardel, J. Nigou, G. Puzo, F. Erard, and B. Ryffel. 2004. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent positive and TLR2-independent negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J. Immunol.* **172**: 4425-4434.

D. Dao, **L. Kremer**, Y. Guérardel, A. Molano, W.R. Jacobs Jr., S.A. Porcelli, and V. Briken. 2004. *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and IL-12 production of macrophages. *Infect. Immun.* **72**: 2067-2074.

L'une des conséquences les plus dévastatrices de la tuberculose est la formation des granulomes et la destruction tissulaire de l'organe infecté. Les macrophages sont des cellules prédominantes des granulomes, impliqués dans la sécrétion d'un grand nombre de protéases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. Les métalloprotéinases (MMPs) constituent une famille d'endopeptidases qui participent à de nombreux processus physiologiques (remodelage tissulaire, développement embryonnaire, diapédèse...) et pathologiques (inflammation chronique, cancers...) grâce à leur capacité à dégrader des composants de la matrice extracellulaire (Nagase and Woessner, 1999). La MMP-9, ou gélatinase B, est la principale MMP sécrétée par les monocytes/macrophages au cours d'infections bactériennes. Bien que la MMP-9 représente un facteur essentiel des mécanismes de défense de l'hôte, en facilitant notamment la diapédèse leucocytaire au niveau des sites d'infection, une production excessive de MMP-9 contribuerait également à une destruction tissulaire et une exacerbation de la réponse inflammatoire, comme il a été observé chez des patients infectés avec *M. tuberculosis* (Price *et al.*, 2003). Cependant, très peu d'informations sont connues concernant les molécules mycobactériennes susceptibles d'induire l'expression et l'activation de la MMP-9. Nos récents travaux ont montré, pour la première fois, le rôle du LM en tant que facteur induisant l'expression et la sécrétion de la MMP-9 dans des macrophages humains. Les études d'inhibition, utilisant des anticorps neutralisants dirigés contre des récepteurs de surface du macrophage, ont montré que cette expression est dépendante de TLR1/TLR2 et CD14. De plus, le LM réprime la transcription de l'inhibiteur de la métalloprotéinase TIMP-1, connu comme étant un régulateur majeur des MMP-9. L'ensemble de ces résultats suggère que le LM puisse jouer un rôle fonctionnel majeur dans l'immunopathologie tuberculeuse *via* l'expression de MMP-9 et pourrait conditionner ou influencer le devenir de l'infection ainsi que la destruction pulmonaire chez des patients tuberculeux. Ces conclusions nécessiteraient évidemment d'être étayées par une approche « *in vivo* », notamment par l'administration de LM dans des souris et d'une analyse immunohistologique pour détecter l'expression de la MMP-9 et de TIMP-1 afin de définir leur rôle éventuel dans la destruction tissulaire.

E. Ellass, L. Aubry, M. Masson, A. Denys, Y. Guérardel, E. Maes, D. Legrand, J. Mazurier, and **L. Kremer**. 2005. Mycobacterial lipomannan induces matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in human macrophagic cells through a TLR1/TLR2- and CD14-dependent mechanism. *Infect. Immun.* **73**: 7064-7068.

En résumé, l'ensemble des résultats précédents démontre, pour la première fois, **une série d'activités biologiques associées au LM**, et suggère que ces molécules puissent jouer un rôle dans **l'induction de la réponse inflammatoire chez l'hôte**. Au vue de ces travaux, le LM apparaît comme un facteur d'activation du macrophage et d'induction d'une réponse inflammatoire (donc plutôt bénéfique pour l'hôte). Au contraire, le ManLAM joue un rôle immunosuppresseur causé par la présence de l'arabinane (donc plutôt bénéfique pour la bactérie). Etant donné que LM et LAM coexistent dans la paroi (en quantités variables en fonction de l'espèce), et étant donné que le LM induit un signal positif alors que le LAM semble être immunosuppresseur, la balance LM/LAM pourrait donc être déterminante pour induire une réponse immune qui pourrait être soit favorable à l'hôte, soit à la mycobactérie (Fig. 6). En effet, la sécrétion de cytokine de type TH₁ comme l'IL-12 permet le contrôle de l'infection mycobactérienne (Cooper *et al.*, 1997). Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α participent au recrutement cellulaire qui aboutit à la formation du granulome dans le but est de contenir l'infection et d'éviter la dissémination de bacille dans l'hôte infecté (Kindler *et al.*, 1989). Ainsi, une balance en faveur du LM par rapport au LAM serait plutôt défavorable à la mycobactérie. Il faut toutefois nuancer ces propos, car l'accessibilité du LM au sein de la paroi reste un paramètre à prendre en considération mais qui reste toutefois mal connu. En effet, d'un point de vue stérique, le LAM est beaucoup plus encombrant que le LM ce qui pourrait empêcher ce dernier d'interagir avec les cellules hôtes. De plus, il est possible que la mycobactérie soit capable de moduler l'expression du LM et/ou du LAM au cours de l'infection ce qui pourrait avoir des conséquences directes sur l'orientation de la réponse immune. Cependant, aucune donnée concernant une régulation éventuelle des ces molécules dans des conditions intramacrophagiques n'est connue à l'heure actuelle.

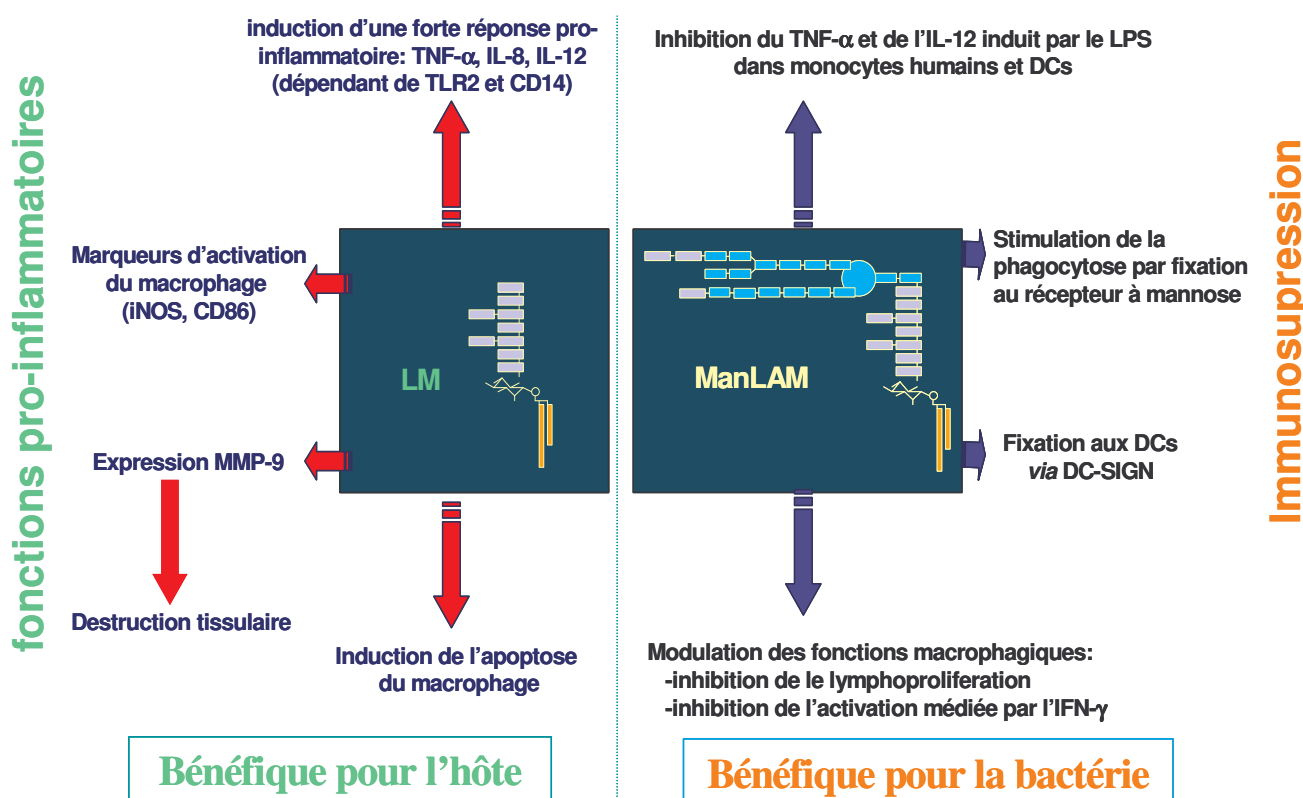


Fig. 6: Principales fonctions biologiques associées au LMs et ManLAMs

V. Briken, S. A. Porcelli, G. S. Besra, and L. Kremer. 2004. Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol. Microbiol.* **53**: 391-403

3.3 Identification et caractérisation d'un nouveau lipide mycobactérien

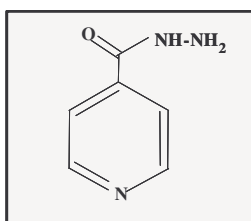
Un de nos objectifs concerne l'identification et la caractérisation de nouveaux composants lipidiques ou glycolipidiques, en particuliers ceux en rapport avec les mycolates. Pour cela, nous avons criblé une large gamme d'espèces mycobactériennes en réalisant une analyse systématique de leurs lipides par chromatographie en couche mince bi-dimensionnelle. D'abord identifié chez *M. kansasii* (un pathogène humain principalement rencontré chez les individus immunodéprimés provoquant des pathologies pulmonaires et extra-pulmonaires sévères et dont la prévalence est en augmentation (Alcaide *et al.*, 1997), nous avons identifié un **nouveau lipide apolaire** dans toutes les espèces mycobactériennes testées. La présence ubiquitaire de ce lipide suggère qu'il joue probablement un rôle important dans la physiologie de la mycobactérie. Des expériences de marquage, ainsi que la purification de ce composé combiné à des études de RMN, ont permis d'établir sa structure. Ce lipide est un triacylglycérol (TAG) très particulier, caractérisé par la présence d'un substituant de type méromycolyl, un précurseur direct des acides mycoliques. Cette nouvelle molécule, baptisé « **mono-méromycolyl diacylglycérol** » ou MMDAG, pourrait représenter une source de méromycolates lors de la synthèse des acides mycoliques.

L. Kremer, C. de Chastellier, G. Dobson, K. J. C. Gibson, P. Bifani, S. Balor, JP. Gorvel, C. Loch, D. E. Minnikin, and G. S. Besra. 2005. Identification and structural characterization of an unusual mycobacterial monomeromycolyl-diacylglycerol. *Mol. Microbiol.* **57**: 1113-1126.

3.4 L'isoniazide, un inhibiteur de l'énoyl-AcpM réductase InhA

L'isoniazide ou INH (Fig. 7) est un antituberculeux de première ligne, qui depuis 1952, reste très largement utilisé étant donné sa très forte efficacité d'action contre *M. tuberculosis* (Kremer and Besra, 2002). L'INH est une pro-drogue qui, pour inhiber la biosynthèse des acides mycoliques, doit être activée par la catalase-péroxydase KatG de *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 1992).

Fig. 7: Structure chimique de l'isoniazid (INH)



La compréhension du mécanisme d'action de l'INH a suscité beaucoup d'intérêt depuis quelques années. Des études très largement menées par l'équipe du Pr W. R. Jacobs (Albert Einstein College of Medicine, Bronx) depuis une dizaine d'années suggèrent que l'INH cible l'énoyl AcpM réductase InhA du système FAS-II (Banerjee *et al.*, 1994) (Fig. 3). Plus récemment, une autre équipe a proposé KasA comme étant la cible de l'INH, remettant en question le rôle de InhA comme cible primaire de cet antibiotique (Mdluli *et al.*, 1998). Étant donné l'importance de la question quant à la véritable cible de l'INH, et afin de mettre un terme à un ensemble de données contradictoires présentées dans la littérature, nous avons déterminé laquelle de ces deux enzymes, KasA ou InhA, représente la cible primaire de l'INH chez *M. tuberculosis*. Pour cela, nous avons utilisé deux approches. Dans une approche *in vivo*, nous avons montré que la surexpression de InhA, mais pas de KasA, conduisait à une augmentation de la résistance à l'INH chez *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG et *M. tuberculosis*, suggérant que InhA est la cible.

Dans une seconde approche, *in vitro*, basée sur l'inhibition des enzymes InhA et KasA purifiées, nous avons montré que la forme activée de l'INH inhibe l'activité catalysée par InhA ($IC_{50} = 7 \mu M$), alors qu'aucune inhibition de l'activité KasA n'a pu être observée. Nos données indiquent donc clairement que InhA constitue la cible primaire de l'INH.

M. H. Larsen, C. Vilchèze, **L. Kremer**, G. S. Besra, L. Parsons, M. Salfinger, L. Heifets, M. Hazbon, D. Alland, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs, Jr. 2002. Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG, and *M. tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **46**: 453-466.

L. Kremer, L. G. Dover, H. R. Morbidoni, C. Vilchèze, W. N. Maughan, A. Baulard, S. C. Tu, N. Honoré, V. Deretic, J. C. Sacchettini, C. Loch, W. R. Jacobs, Jr., and G. S. Besra. 2003. Inhibition of InhA activity, but not KasA activity, induces formation of a KasA-containing complex in mycobacteria. *J. Biol. Chem.* **278**: 20547-20554.

En collaboration avec l'équipe du Dr. Jacobs, nous avons récemment poursuivi ces travaux et confirmé le rôle de InhA en tant que cible de l'INH. Une nouvelle stratégie a été mise au point basée sur le développement d'un outil génétique très performant appelé "transduction spécialisée" et qui permet de générer des souches isogéniques de *M. tuberculosis* qui ne diffèrent que par une simple mutation ponctuelle dans le chromosome bactérien. Ainsi, une souche de *M. tuberculosis* portant la mutation S94A dans le gène *inhA* a été créée. Les analyses pharmacologiques, biochimiques et structurales montrent clairement que la souche renfermant la mutation S94A devient résistante à l'INH par rapport à la souche contenant le gène sauvage, confirmant le rôle de InhA en tant que cible primaire de l'INH.

C. Vilchèze, F. Wang, M. Arai, M. H. Hazbón, R. Colangeli, **L. Kremer**, T. R. Weisbrod, D. Alland, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs, Jr. 2006. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis inhA* elucidates the target of isoniazid. *Nat. Med.* **12**: 1027-1029.

L'ensemble de ces travaux souligne l'importance des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides mycoliques et du système FAS-II. Ces études montrent, en effet, que certaines molécules antimycobactériennes telles que la TLM ou l'INH agissent en inhibant des enzymes de la synthèse des acides mycoliques, en l'occurrence KasA, KasB et InhA. Elles suggèrent également que KasA et KasB représentent des cibles très attractives pour le développement de nouvelles molécules antituberculeuses.

4. Période 2004/2006

Chargé de Recherche (CR1) au sein de l'UMR 5235 (anciennement UMR 5539), Université de Montpellier II

"Biosynthèse, structure et fonctions des lipides chez Mycobacterium tuberculosis et Plasmodium falciparum"

L'étude des voies de biosynthèse des facteurs de virulence chez les mycobactéries pourrait non seulement mener à une meilleure compréhension de la pathogénie tuberculeuse, mais également à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, voire au développement de nouveaux antibiotiques pour le traitement de la tuberculose. Le contrat ATIP du CNRS que j'ai obtenu m'a permis d'amplifier le capital financier et humain afin de créer une équipe nouvelle et autonome, au sein de l'UMR, qui soit reconnue dans un contexte hautement compétitif. L'objectif de ce programme de recherche vise à identifier et caractériser des gènes impliqués dans la synthèse de facteurs de virulence et à déterminer la structure de ces derniers (notamment le LAM) pour en

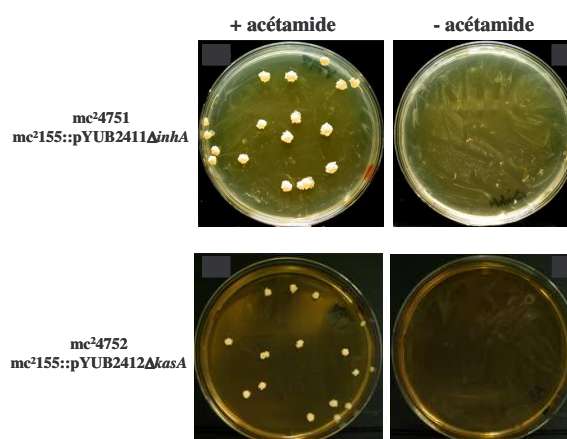
étudier leurs fonctions biologiques, leur participation dans la pathogénie tuberculeuse, et enfin à identifier/valider de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutiques.

L. Kremer, and G. S. Besra. 2004. A waxy tale, by *Mycobacterium tuberculosis*. In: Tuberculosis and the Tubercle Bacillus. Eds. Cole, S. T., Eisenach, K. D., McMurray, D. N., and Jacobs, W. R., Jr., pp. 287-308, ASM Press, Washington DC.

4.1 Inactivation de *InhA* et *KasA* chez *M. smegmatis* et validation de *KasA* en tant que cible thérapeutique

Nous avons précédemment montré que la TLM inhibe la biosynthèse des acides mycoliques en bloquant l'activité de condensation de la β -ketoacyl ACP synthase, *KasA*. L'objectif ici était de déterminer le caractère essentiel du gène *kasA*, ce qui est un pré-requis pour valider un gène comme cible thérapeutique. En collaboration avec l'équipe du Dr. W. R. Jacobs, un nouvel outil génétique baptisé CESTET (Conditional Expression Specialized Transduction Essentiality Test) qui permet d'inactiver des gènes essentiels chez les mycobactéries a été développé. Ce système consiste à déléter un gène essentiel dans une souche de *M. smegmatis* mérodipléide contenant par ailleurs une copie plasmidique du gène en fusion transcriptionnelle avec un promoteur inducible à l'acétamide. Les transductants de gènes essentiels ne sont capables de pousser qu'en présence d'acétamide, tandis que les gènes non essentiels poussent en présence et en l'absence d'acétamide. Ce système a été validé en confirmant le caractère essentiel du gène *inhA*, la cible de l'INH, puis appliqué à l'inactivation conditionnelle de *kasA*, ce qui nous a permis de déterminer le caractère essentiel de ce gène (Fig. 8). Ces résultats suggèrent que *KasA* est une cible attractive pour le développement de nouveaux agents antituberculeux.

Fig. 8: Inactivation conditionnelle de *inhA* et *kasA* chez *M. smegmatis* basé sur la technologie CESTET. L'absence de colonies sur milieu contenant l'acétamide indique que *inhA* et *kasA* sont essentiels.



Bhatt, L. Kremer, A. Z. Dai, J. C. Sacchettini, and W. R. Jacobs, Jr. 2005. Conditional depletion of *KasA*, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to mycobacterial cell lysis. *J. Bacteriol.* **187**: 7596-7606.

4.2 Rôle de *KasA* dans la formation des biofilms chez *M. smegmatis*

Les biofilms qui dans certains cas participent à la virulence bactérienne, consistent en des surfaces sur lesquelles adhèrent des communautés microbiennes (Hall-Stoodley and Stoodley, 2005). Parmi les pathogènes humains, les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, et *Vibrio cholerae* ont été très étudiés, tandis que le rôle des biofilms dans la pathogénèse de *M. tuberculosis* ou de *M. leprae* reste incertain. Diverses espèces mycobactériennes atypiques, dont *M. smegmatis*, forment des biofilms (Primm *et al.*, 2004), mais très peu d'événements moléculaires et régulateurs conduisant à ce processus ont été identifiés. Des souches de *M. smegmatis* déficitaires dans la synthèse des glycopeptidolipides de surface ne produisent pas de biofilms (Recht and Kolter, 2001), ce qui reflète le rôle important de composants de la paroi dans l'établissement de ces biofilms.

Le mycobactériophage Bxb1 est un phage tempéré de *M. smegmatis* qui s'intègre dans le site *attB* localisé à l'extrémité 3' du gène *groEL1* codant la chaperone Hsp60 (Ghosh *et al.*, 2003). L'équipe du Dr. G. Hatfull (Pittsburgh Bacteriophage Institute, University of Pittsburgh, PA) a récemment démontré que des souches de *M. smegmatis* renfermant le phage lysogène Bxb1 présentent un défaut de formation de biofilms, ce qui est une conséquence directe de l'inactivation de *groEL1*. La perte de la fonction GroEL1 n'affecte cependant pas la croissance planctonique mais interfère spécifiquement avec la maturation des biofilms. Le comportement d'une souche $\Delta groEL1$ de *M. smegmatis* a révélé que la biosynthèse des acides mycoliques est régulée durant la formation des biofilms et que GroEL1 s'associe physiquement avec KasA pour faciliter cette régulation. Le rôle central des mycolates dans la synthèse des biofilms est illustré par deux observations : d'une part, des mycolates à chaînes carbonées plus courtes (C_{56} - C_{68}) sont produites durant la formation des biofilms et, d'autre part, des souches mutées dans certains composants de FAS-II (en l'occurrence KasB et InhA) présentent des anomalies dans la maturation de biofilm.

A. Ojha, M. Anand, A. Bhatt, **L. Kremer**, W. R. Jacobs, Jr., and G. F. Hatfull. 2005. GroEL1: A dedicated chaperone involved in mycolic acid biosynthesis during biofilm formation in mycobacteria. *Cell*. **123**: 861-873.

4.3. Inactivation de KasB chez *M. tuberculosis* et rôle dans la survie intracellulaire

Contrairement à *kasA* qui est un gène essentiel (paragraphe 4.1), il a été possible d'inactiver le gène *kasB* dans le chromosome de *M. smegmatis* et *M. tuberculosis*. Ainsi, *kasB* ne semble pas être un gène essentiel pour la croissance des mycobactéries. Néanmoins, l'inactivation de ce gène a conduit à des effets surprenants et totalement inattendus : de profonds changements de la morphologie des colonies de *M. tuberculosis* ont été observés, et l'on remarque également la perte du caractère "acido-alcolo résistant" qui constitue une caractéristique fondamentale des mycobactéries et un principe très largement utilisé pour le diagnostic clinique des infections mycobactériennes (Fig. 9A). Au niveau moléculaire, le mutant $\Delta kasB$ possède des méromycolates dont la taille est réduite de 2-6 atomes de carbones, ainsi que de la perte de *trans*-cyclopropanation des acides mycoliques « oxygénés ». L'altération du profil d'acides mycoliques affecte profondément la virulence de la souche : la croissance intracellulaire du mutant $\Delta kasB$ est très sévèrement atténuée dans des souris SCID ainsi que dans les différents organes de souris immunocompétentes. De plus, ce mutant devient incapable d'induire une pathologie et reste totalement inoffensif dans les souris infectées (Fig. 9B). Nous avons participé à ces travaux qui ont largement été menés dans l'équipe du Dr. Jacobs. Ces résultats i) démontrent que KasB joue un rôle primordial en catalysant les dernières étapes du processus d'élongation des acides méromycoliques (en ajoutant les 2-6 derniers atomes de carbone), ii) identifient KasB comme une importante cible thérapeutique car l'inhibition de KasB pourrait fortement atténuer la virulence des mycobactéries intracellulaires, d'où l'intérêt de développer de nouveaux analogues de la TLM (paragraphe 2.3), et iii) suggèrent que le mutant $\Delta kasB$ pourrait représenter un candidat en tant que vaccin vivant atténué puisqu'il est dans l'incapacité d'induire une pathologie.

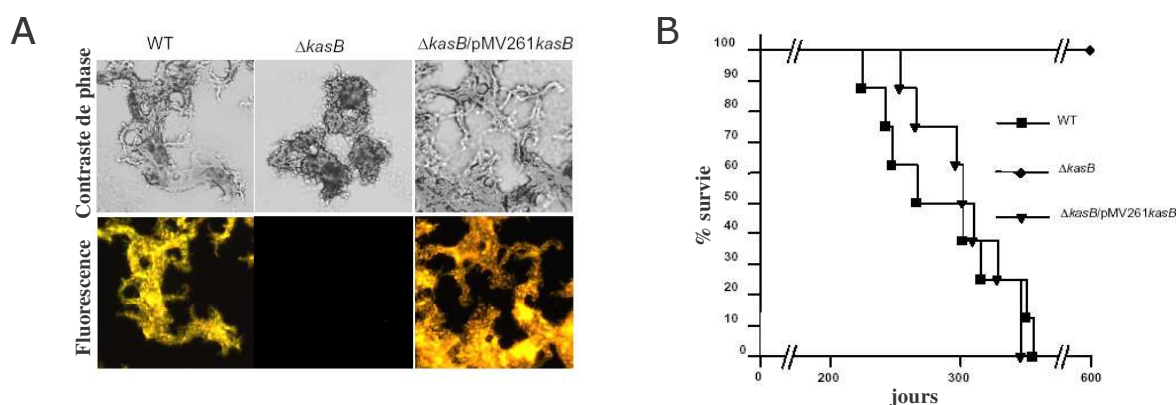


Fig. 9: (A) Perte de la capacité du mutant $\Delta kasB$ à retenir la coloration caractéristique des mycobactéries après traitement avec une solution acido-alcolique. L'introduction dans cette souche du plasmide pMV261/*kasB* restaure la coloration fluorescente avec auramine-rhodamine (X40) de la même façon que la souche sauvage (WT). **(B)** Courbe de survie des souches sauvage (WT), $\Delta kasB$ et complémentée $\Delta kasB$ (pMV261/*kasB*) de *M. tuberculosis* CDC1551 dans des souris C57BL/6.

A. Bhatt, N. Fujiwara, K. Bhatt, S. S. Gurucha, **L. Kremer**, B. Chen, J. Chan, S. Porcelli, K. Kobayashi, G. S. Besra, and W. R. Jacobs, Jr. 2007. Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. In Press.

4.4 Identification et caractérisation de substrats phosphorylés par les Sér/Thr protéines kinases en rapport avec la synthèse de composants de la paroi chez *M. tuberculosis*

4.4.1 Les Sér/Thr protéines kinases et la phosphorylation de EmbR par PknH

La phosphorylation des protéines par des Sér/Thr protéines kinases (STPKs) est, depuis très récemment, devenue d'une importance physiologique majeure à cause de leur possible participation dans la virulence chez les bactéries pathogènes. Bien que *M. tuberculosis* possède 11 STPKs (Cole *et al.*, 1998), la nature et les fonctions des substrats de ces enzymes restent très peu connues et les données expérimentales concernant leur rôle dans la transduction du signal et/ou leur association avec leur(s) substrat(s) endogène(s) restent très éparpillées (Av-Gay and Everett, 2000). Depuis quelques années, nous nous intéressons à la caractérisation et l'étude du rôle potentiel des STPKs dans les mécanismes de virulence chez la *M. tuberculosis* et à l'identification de leurs substrats. Nos études ont notamment porté sur le couple PknH/EmbR. Une des raisons du choix de PknH parmi les 11 STPKs repose sur le fait que la protéine EmbR, dont le gène est adjacent à *pknH*, est fortement suspectée pour intervenir dans la modulation de l'activité arabinosyltransférase impliquée dans la synthèse de l'arabinane du LAM et de l'arabinogalactane (Belanger *et al.*, 1996). Nous avons donc surproduit et purifié PknH afin de tester *in vitro* son activité d'autophosphorylation. De plus, des mutations ponctuelles réalisées au niveau des différents résidus appartenant au domaine catalytique de PknH ont également montré que l'activité enzymatique de cette STPK était modulée par la phosphorylation d'une thréonine positionnée dans la boucle d'activation de l'enzyme. Dans un second temps, nous avons montré que la protéine EmbR était capable d'interagir avec PknH lors de tests d'interaction et de phosphorylation réalisés *in vitro*. Cette phosphorylation de EmbR par PknH constitue le premier exemple d'un substrat endogène phosphorylé par une STPK chez *M. tuberculosis* (Molle *et al.*, 2003). Par ailleurs, EmbR est caractérisé par un domaine FHA (Forkhead Associated) au niveau de son extrémité C-terminale. Ce domaine, décrit à ce jour uniquement chez les eucaryotes, est impliqué dans des mécanismes d'interaction entre protéines et, plus particulièrement, dans la reconnaissance de protéines phosphorylées sur la thréonine. Ceci nous a conduit à étudier le rôle de FHA au niveau de l'interaction et de la phosphorylation de EmbR par PknH. Des mutants ponctuels dans FHA et des expériences de "Pull-down" ont permis de démontrer que la phosphorylation de EmbR par PknH dépendait de plusieurs résidus clés du domaine FHA.

La caractérisation du rôle joué par le domaine FHA de EmbR dans les mécanismes de reconnaissance et de phosphorylation entre EmbR et PknH constitue la première description du rôle d'un domaine FHA chez les procaryotes. Ceci nous a amené à collaborer avec l'équipe du Dr. Fütterer (School of Biosciences, University of Birmingham, UK) pour élucider la structure cristallographique de EmbR, protéine de la famille SARP (*Streptomyces coelicolor* antibiotic regulatory protein) intervenant dans la biosynthèse de métabolites secondaires (Fig. 10). En conclusion, l'ensemble de ces résultats nous a permis de progresser dans la connaissance des Sér/Thr kinases de *M. tuberculosis* à travers la caractérisation de EmbR.

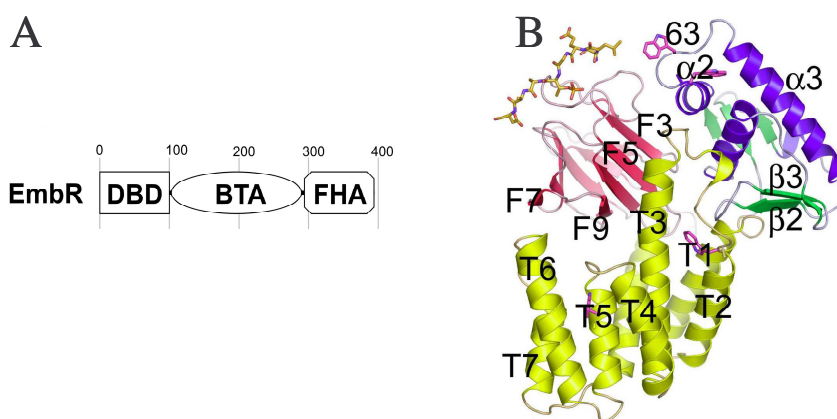


Fig. 10: **(A)** Principaux domaines protéiques présents dans EmbR. DBD, DNA-binding domain ; BTA, Bacterial transcriptional activation domain ; FHA, Forkhead associated domain. **(B)** Structure tri-dimensionnelle de EmbR co-cristallisé en présence d'un phosphopeptide. Le domaine DBD est représenté en violet (hélices α) et vert (feuillets β), les domaines BTA et FHA sont indiqués en jaune et rouge, respectivement.

V. Molle, **L. Kremer**, C. Girard-Blanc, G. S. Besra, A. J. Cozzone, and J. F. Prost. 2003. A FHA phosphoprotein recognition domain mediates EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr Protein Kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*. **42**: 15300-15309. **Contribution égale des deux premiers auteurs.**

L. J. Alderwick, V. Molle, **L. Kremer**, A. J. Cozzone, T. R. Dafforn, G. S. Besra, and K. Fütterer. 2006. Molecular structure of EmbR, a response element of Ser/Thr kinase signaling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**: 2558-2563.

4.4.2 La phosphorylation de KasA et KasB module leur activité de condensation

Il est hautement probable que la biosynthèse des acides mycoliques soit régulée chez *M. tuberculosis* en fonction des stimuli environnementaux, tels que ceux perçus dans le phagosome du macrophage infecté. Cependant, très peu d'informations sont connues concernant les mécanismes moléculaires permettant aux mycobactéries pathogènes de moduler la composition des mycolates en réponse à ces changements environnementaux. Aucun rapport ne fait mention à l'heure actuelle de quelconques mécanismes agissant soit au niveau transcriptionnel et/ou au un niveau post-traductionnel pour expliquer comment la mycobactérie module la synthèse de ses mycolates. Ceci est pourtant d'une importance capitale pour comprendre la remarquable capacité de survie et d'adaptation de ce pathogène au sein de l'hôte infecté. Nous avons, dès lors, exploré la possibilité que la synthèse des mycolates puisse, du moins partiellement, être régulée au niveau post-traductionnel par phosphorylation de composants majeurs du système FAS-II.

Grâce à notre expérience acquise au cours de l'étude PknH/EmbR, nous avons pu démontrer que KasA et KasB sont des substrats de plusieurs STPKs de *M. tuberculosis* *in vitro*, suggérant un réseau complexe d'interactions entre les différents kinases et leurs substrats. Par ailleurs, KasA et KasB sont phosphorylés exclusivement au niveau de résidus Thr. Nous avons observé que KasA et KasB sont phosphorylés très efficacement *in vivo* chez *M. bovis* BCG au niveau de plusieurs sites distincts, et qui peuvent être déphosphorylés *in vitro* en présence de la Sér/Thr phosphatase PstP de *M. tuberculosis*. Ces résultats sont la première démonstration de la phosphorylation de composants du système FAS-II chez un procaryote. De plus, nos études enzymatiques ont révélé que la phosphorylation diminue l'activité de condensation de KasA dans le processus l'élongation des chaînes d'acides gras, tandis qu'elle augmente l'activité de condensation de KasB. Ainsi, cet effet différentiel de la phosphorylation pourrait représenter un mécanisme original et unique de régulation du système FAS-II (Fig. 11). Il permettrait aux mycobactéries pathogènes d'assurer la synthèse d'acides mycoliques "matures", nécessaires pour assurer leur adaptation et leur survie intracellulaire (voir paragraphe 4.3).

V. Molle, A. K. Brown, G. S. Besra, A. J. Cozzone, and L. Kremer. 2006. The condensing activities of the *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase are differentially regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **281**: 30094-30103.

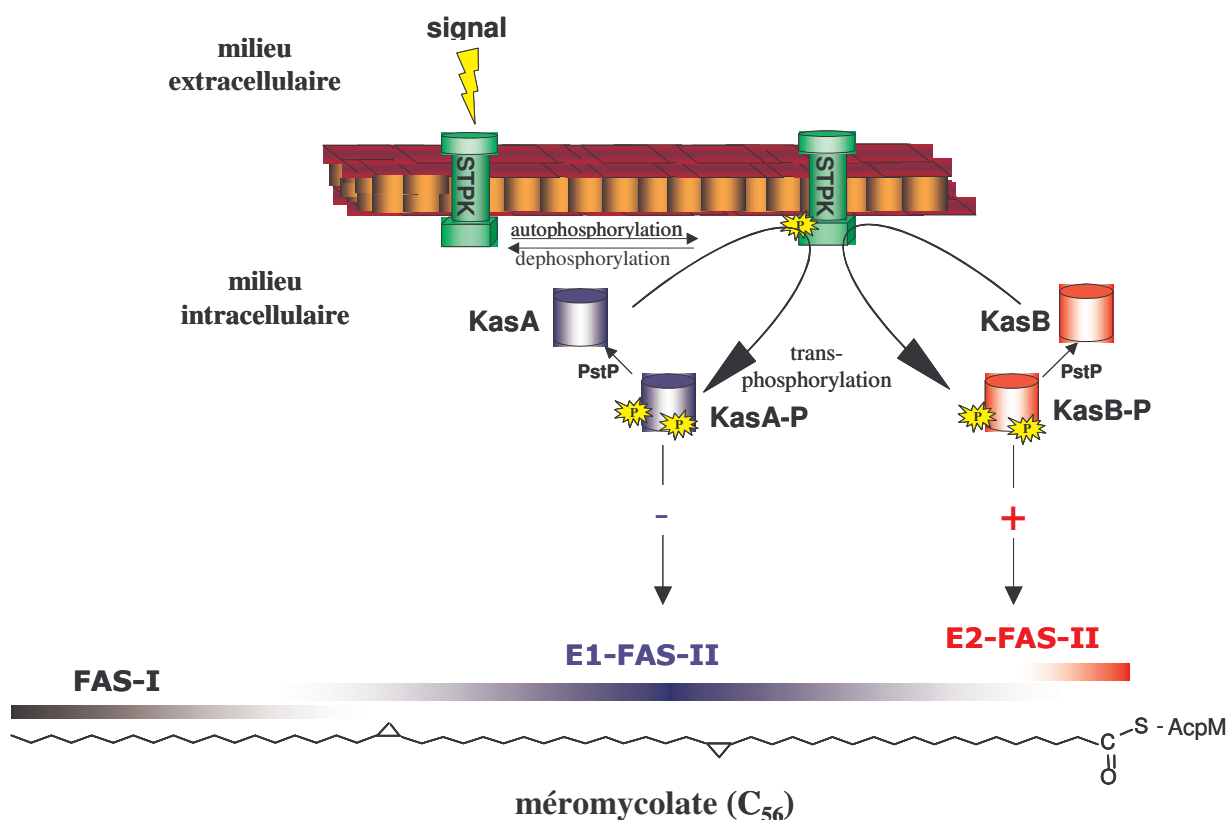


Fig. 11: Modèle de régulation du système FAS-II et du processus d'élongation du méromycolate par phosphorylation des enzymes de condensation. Des changements de la composition des acides mycoliques en réponse au stress environnementaux représentent un élément central de la capacité d'adaptation de *M. tuberculosis* durant l'infection. Les stimuli sont perçus par la bactérie grâce aux STPKs présentes dans la membrane mycobactérienne. Lorsqu'un signal est reçu, les STPKs sont phosphorylées et le signal est transmis à KasA et KasB par trans-phosphorylation. Nos résultats suggèrent un mécanisme de régulation différentielle des activités de KasA et KasB, chaque enzyme faisant partie d'un complexe d'élongation spécialisé, E1-FASII comprenant KasA, et E2-FASII comprenant KasB. E1-FASII allonge les acyl-AcpM issus de FASI pour produire des chaînes plus longues, tandis que E2-FASII termine le processus d'élongation en ajoutant les 2-6 derniers atomes de carbone au niveau du site proximal du méromycolate; la production des mycolates de taille complète étant indispensable pour que la mycobactérie pathogène soit capable de survivre dans l'hôte infecté. Ainsi, nous proposons que, pour assurer la synthèse complète de ses mycolates, la mycobactérie régule différemment les systèmes E1-FASII et E2-FASII par phosphorylation de KasA et KasB.

Projet de Recherche

D'une manière globale, le projet de recherche regroupera deux type de travaux:

- i) un ensemble d'études qui se trouve dans la logique et la continuation des travaux précédents, en vue d'améliorer nos connaissances sur la biosynthèse/régulation des acides gras/mycoliques et du LAM chez *M. tuberculosis* et**
- ii) des études utilisant notre expérience et connaissances du système FAS-II mycobactérien pour étudier la biosynthèse des acides gras chez *Plasmodium falciparum*, l'agent du paludisme.**

1. Le phosphoprotéome du système FAS-II chez *M. tuberculosis* : caractérisation et rôle fonctionnel de la phosphorylation dans la synthèse et la régulation des mycolates ainsi que dans la virulence mycobactérienne

Une première étape vers l'identification et la caractérisation des mécanismes régulateurs de la biosynthèse des acides mycoliques vient d'être franchie avec la description du rôle de la phosphorylation au niveau des enzymes de condensation KasA et KasB. Ces résultats laissent à penser que la phosphorylation pourrait également moduler l'activité d'autres composants de FAS-II. Afin d'analyser plus en détail ces hypothèses, nous nous proposons :

- d'étendre nos études initiales par une analyse détaillée du phosphoprotéome de FAS-II chez *M. tuberculosis* en identifiant et caractérisant de nouveaux substrats des STPKs (en l'occurrence InhA, MabA, et mtFabH...)
- d'identifier les sites de phosphorylation des substrats FAS-II
- de générer par mutagenèse dirigée les mutants correspondants pour lesquels les sites de phosphorylation identifiés seront substitués par des résidus glutamate qui miment l'état de phosphorylation. Ces mutants seront utilisés pour des études cristallographiques afin de mieux comprendre comment la phosphorylation induit un changement conformationnel qui module l'activité enzymatique
- d'examiner la contribution relative de la phosphorylation dans la biosynthèse et la régulation des acides mycoliques ainsi que dans la virulence mycobactérienne, en dérivant des souches isogéniques de *M. bovis* BCG et *M. tuberculosis* incapables de phosphoryler les composants de FAS-II (par mutagenèse dirigée des sites de phosphorylation en alanine grâce à la "transduction spécialisée", voir paragraphe 3.4)
- d'étudier l'immunobiologie des mutants définis de *M. bovis* BCG et *M. tuberculosis* en suivant leur capacité à être phagocytés, à croître en milieu liquide ainsi que dans des cellules ou des souris infectées, en réalisant des études histologiques et immunopathologiques etc ...

Ces études devraient conduire à une meilleure compréhension des mécanismes de régulation des mycolates, qui représentent un processus central permettant aux mycobactéries pathogènes de s'adapter et de survivre dans l'hôte infecté. De plus, interférer avec ces mécanismes de régulation (par exemple en inhibant spécifiquement la phosphorylation de FAS-II) pourrait ouvrir la voie sur de nouveaux développements thérapeutiques. Cette notion est appuyée par le fait que des inhibiteurs spécifiques de kinases ont été développés avec succès pour le traitement de maladies diverses (Shawver *et al.*, 2002) et qu'un inhibiteur spécifique de la kinase mycobactérienne PknG bloque totalement la capacité de survie intracellulaire de *M. tuberculosis* (Walburger *et al.*, 2004).

2. Identification et caractérisation des arabinosyltransférases de la synthèse du LAM

Le LAM dérive du LM par la présence d'un domaine arabinane qui est le fruit de l'action des arabinosyltransférases (AraT). Or, LM et LAM co-existent dans la paroi. Nos précédents résultats suggèrent qu'une balance en faveur du LM par rapport au LAM serait plutôt favorable à l'hôte, tandis qu'une balance en faveur du LAM serait favorable à la bactérie (voir paragraphe 3.2). Il est possible que la mycobactérie soit capable de moduler l'expression du LM et/ou du LAM au cours de l'infection ce qui pourrait avoir des conséquences directes sur l'orientation de la réponse immune et le contrôle de l'infection. Cependant, aucune donnée concernant une régulation éventuelle de ces molécules dans des conditions intramacrophagiques n'est connue à l'heure actuelle. Nous nous proposons donc d'identifier et d'analyser les AraTs du LAM afin de pouvoir générer des souches mycobactériennes affectées dans leur balance LM/LAM. Ceci permettra d'analyser le rôle des AraTs dans la virulence et d'étudier, *in vivo*, l'influence de la balance LM/LAM dans l'établissement de l'infection et son contrôle par le système immunitaire.

- **Approche d'identification des arabinosyltransférases du LAM.** Notre stratégie vise à identifier des AraTs à l'aide des banques de données, par recherche d'homologie avec des glycosyltransférases connues chez d'autres organismes. Bien que plusieurs gènes doivent être impliqués dans la biosynthèse de l'arabinane, aucun n'a été caractérisé à l'heure actuelle. La disponibilité récente de séquences génomiques entières de plusieurs espèces mycobactériennes permet l'identification des gènes conservés. En effet, la production d'une même molécule par deux souches distinctes nécessitent que ces deux souches aient conservé les voies métaboliques de ce composé et donc leurs gènes correspondants. Ainsi, le génome de la souche de référence *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.*, 1998) laisse apparaître au moins 37 glycosyltransférases potentielles, dont seules une quinzaine ont pu être fonctionnellement identifiées. L'approche réalisée réside dans l'analyse différentielle des génomes de diverses espèces mycobactériennes productrices de LAM. Ce résultat est en adéquation avec une approche systématique d'inactivation génique. Ainsi, les souches mutées et générées par recombinaison homologue seront incapables de produire le métabolite d'intérêt dans son intégralité.

- **Inactivation génique des gènes codant les AraTs.** La technologie CESTET (voir paragraphe 4.1) sera appliquée à l'ensemble des gènes codant des AraTs potentielles pour réaliser leur inactivation conditionnelle chez *M. smegmatis*.

- **Analyses biochimiques des souches déficientes en AraT non-essentiels.** Les souches de *M. smegmatis* mutées obtenues grâce à la stratégie CESTET seront criblées par immunoempreinte à l'aide de l'anticorps monoclonal CS-35. Cet anticorps permet de distinguer le LAM du LM, directement sur un lysat total de mycobactérie de part sa spécificité de reconnaissance du motif Ara₆ terminal de l'arabinane du LAM (Kaur *et al.*, 2002). Ceci nous permettra de mettre en évidence les éventuelles formes tronquées du LAM. Dans un second temps, une analyse de la composition en sucres nous permettra de mettre en relation le gène inactivé avec la synthèse de l'arabinane. Pour cela, les LAM amputés d'une partie ou de la totalité de leur domaine arabinane et obtenus à partir des souches mutantes seront purifiés et analysés comme décrit précédemment (Guérardel *et al.*, 2002 ; 2003). La composition en monosaccharides (arabinose et mannose) étudiée par GC/MS nous renseignera directement sur le degré de troncature de ces LAMs. Enfin, la structure détaillée des LAMs « tronqués » sera réalisée par RMN en collaboration avec l'équipe du Dr. Y. Guérardel.

- **Etudes immunobiologiques des souches mycobactériennes déficientes en LAM.** Les gènes candidats retenus précédemment chez *M. smegmatis* seront alors inactivés chez *M. tuberculosis* et *M. bovis* BCG afin de générer des souches déficientes en LAM. La création de telles souches altérées dans la balance LM/LAM nous permettra alors d'établir la réelle participation de ces lipoglycanes dans la virulence mycobactérienne. Les souches mutées de *M. bovis* BCG seront utilisées pour infecter des macrophages humains et examiner leur capacité à être

phagocyté et à induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, TNF- α et IL-12). La capacité de survie des mutants respectifs de *M. tuberculosis* sera testée dans le modèle murin. L'obtention d'éventuelles souches de *M. tuberculosis* « atténuées » pourrait également constituer la base pour le développement de nouvelles souches vaccinales capables d'induire un degré de protection durable, comparable ou supérieur à celui du BCG.

3. La synthèse des acides gras chez *Plasmodium falciparum*

Notre thématique de recherche qui a pour but d'étudier des composants de la paroi mycobactérienne s'inscrit directement dans cadre de l'UMR 5235 intitulée "Dynamique des Interactions Membranaires Normales et Pathologiques". Elle est donc en parfait accord avec la thématique globale du laboratoire qui vise notamment à décrire la voie de biosynthèse de certains lipides chez *P. falciparum*, l'agent du paludisme. La cohérence est d'autant plus importante que le système de biosynthèse des acides gras (FAS-II) auquel nous nous intéressons chez *M. tuberculosis* est également présent chez les apicomplexes (Waller *et al.*, 1998). Ainsi, nos connaissances sur la biosynthèse des lipides chez les mycobactéries nous ont récemment incité à essayer de mieux comprendre la biogenèse des acides gras chez *P. falciparum*, en l'occurrence celle de l'acide oléique, un composant majeur des phospholipides membranaires du parasite.

3.1 Contexte du projet et résultats préliminaires

Plasmodium falciparum est l'agent responsable de la forme la plus sévère de paludisme, une maladie affectant plus de 40% de la population mondiale et responsable de plus d'un million de décès/an. Malheureusement, les moyens curatifs pour lutter contre le paludisme sont restreints à quelques familles de molécules. De plus, le développement de résistances à la plupart des antipaludiques réduit considérablement l'efficacité des traitements. Il est donc urgent de développer de nouveaux agents antipaludiques et d'identifier de nouvelles cibles pharmacologiques pour accroître notre arsenal thérapeutique contre ce fléau.

Nous avons récemment identifié une molécule, NAS-91, capable d'inhiber la croissance de *M. bovis* BCG en inhibant à la fois la synthèse des acides mycoliques ainsi que la synthèse de l'acide oléique ($C_{18:1} \Delta^9$), vraisemblablement en bloquant une stéaroyl-CoA Δ^9 -désaturase (SCD), enzyme catalysant la formation d'une double liaison entre les carbones 9 et 10 du stéaroyl-CoA, générant l'oléyl-CoA, précurseur direct de l'acide oléique (Fig. 12). Par ailleurs, cette molécule inhibe également la croissance intraérythrocytaire de *P. falciparum* ($CI_{50} \approx 1.5 \mu M$). Afin d'élucider le mécanisme d'action de NAS-91 chez *P. falciparum* et de déterminer l'effet de cette molécule sur la synthèse d'acide oléique (essentiel dans la composition des phospholipides membranaires), nous avons identifié, sur base d'homologie de séquence avec des SCD connues, le gène *PfE0555w* spécifiant une SCD potentielle (PfSCD).

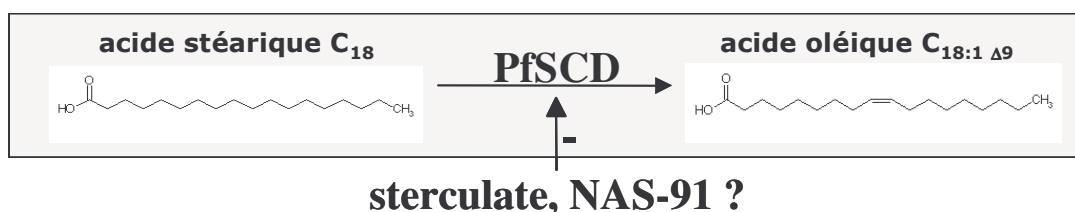


Fig. 12: Biosynthèse de l'acide oléique

3.2 Objectifs et perspectives

- **La SCD comme cible de NAS-91.** Nous déterminerons le mode d'action de NAS-91 chez *P. falciparum* en caractérisant la SCD plasmodiale PfE0555 et en étudiant l'effet de NAS-91 sur l'activité enzymatique de cette enzyme. Dans ce but, nous tenterons de surexprimer la SCD potentielle chez *P. falciparum*, ce qui nous permettra de déterminer le degré de résistance des parasites transgéniques à NAS-91 et au sterulate, connu comme étant un inhibiteur spécifique des

stéaroyl-CoA $\Delta 9$ -désaturase; l'idée est que dans le cas où PFE0555w serait une cible de NAS-91, les parasites surexprimant la SCD présenteront une résistance accrue à l'inhibiteur. La transfection des parasites sera réalisée en exploitant un système génétique performant récemment décrit par Nkrumah *et al.* (2006). Celui-ci est basé sur l'utilisation d'une lignée de *P. falciparum* contenant un site *attB* intégré de manière stable dans son chromosome. L'intégration du gène codant la SCD potentielle se fera à l'aide de l'intégrase du mycobactériophage Bxb1 qui catalyse la recombinaison entre un site *attP* entrant (présent sur le même plasmide que le gène de la SCD) et le site *attB* chromosomique.

Par ailleurs, une approche génétique sera basée sur la mise au point d'un test de complémentation fonctionnelle du gène de la SCD chez un mutant de levure Y24422 Δ *ole1* déficient pour la synthèse d'oléate, suite à l'inactivation du gène *ole1*. Le but est de surexprimer la SCD plasmodiale potentielle et de voir si on restaure la croissance de cette souche mutante sur milieu de culture dépourvu d'acides gras insaturés. Cette méthode s'est déjà avérée fructueuse pour caractériser la SCD de rat.

- **Caractérisation biochimique de la SCD plasmodiale.** L'activité enzymatique de la protéine PfE555 recombinante (obtenue chez *E. coli* ou chez la levure) sera caractérisée et comparée à celle d'autres SCD connues, ce qui nous renseignera sur la fonction de cette protéine (SCD) et son rôle éventuel dans la synthèse de l'acide oléique.

- **Immunolocalisation de la SCD plasmodiale.** Chez le rat, la SCD est associée aux membranes du reticulum endoplasmique. Or, chez *Plasmodium*, la synthèse *de novo* des acides gras a lieu dans l'apicoplaste, un organite acquis suite à l'endosymbiose secondaire d'une algue (Kohler *et al.*, 1997). L'immunolocalisation (à l'aide d'anticorps spécifiques) nous permettra de savoir si chez *Plasmodium*, la SCD est associée aux membranes du RE ou de l'apicoplaste, et renseignera donc sur le lieu de la synthèse de l'acide oléique chez le parasite.

- **Tests pharmacologiques *in vitro*.** En parallèle, nous tenterons de générer des analogues structuraux de NAS-91 et de l'acide sterculique et nous déterminerons leur activité contre différents isolats cliniques de *P. falciparum*. De la même façon, nous testerons l'effet de ces molécules chez *Babesia bovis*, agent de la babésiose bovine et pathogène important d'un point de vue vétérinaire. En effet, *Babesia* appartient au phylum des Apicomplexes, et présente de nombreux points communs avec *Plasmodium*.

- **Tests pharmacologiques *in vivo*.** Dans le but d'étudier l'effet protecteur de NAS-91 et de ses analogues, ces différentes molécules seront testées *in vivo* dans des souris infectées avec *Plasmodium vinckei*, l'agent du paludisme murin.

4. Perspectives du projet de recherche

Concernant l'évolution des connaissances dans le domaine médical, l'ensemble du projet, qu'il s'agisse des acides mycoliques ou du LAM, devrait améliorer nos connaissances relatives à la pathogénie tuberculeuse. Il devrait également nous permettre de mieux comprendre le rôle et l'importance des acides gras chez les apicomplexes et peut-être de valider la stéaroyl-CoA désaturase comme nouvelle cible thérapeutique à exploiter pour le traitement du paludisme et/ou de la tuberculose.

Bibliographie

- Alcaide, F., Richter, I., Bernasconi, C., Springer, B., Hagenau, C., Schulze-Robbeke, R., Tortoli, E., Martin, R., Bottger, E. C., and Telenti, A. 1997. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1959-64.
- Av-Gay, Y., and Everett, M. 2000. *Trends Microbiol.* **8**: 238-244.
- Banerjee, A., Dubnau, E., Quemard, A., Balasubramanian, V., Um, K. S., Wilson, T., Collins, D., de Lisle, G., and Jacobs, W. R., Jr. 1994. *Science* **263**: 227-230.
- Barry, C. E., Lee, R. E., Mdluli, K., Sampson, A. E., Schroeder, B. G., Slayden, R. A., and Yuan, Y. 1998. *Prog. Lipid Res.* **37**: 143-179.
- Belanger, A. E., Besra, G. S., Ford, M. E., Mikusova, K., Belisle, J. T., Brennan, P. J., and Inamine, J. M. 1996. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**: 11919-11924.
- Brennan and Nikaido, 1995. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 29-63.
- Colditz, G. A., Brewer, T. F., Berkey, C. S., Wilson, M. E., Burdick, E., Fineberg, H. V., and Mosteller, F. 1994. *JAMA* **271**: 698-702.
- Cole, S. T. et al., 1998. *Nature* **393**: 537-544.
- Cooper, A. M., Magram, J. Ferrante, J., and Orme, I. M. 1997. *J. Exp. Med.* **186**: 39-45.
- Dye, C. 2006. *Lancet* **367**: 938-840.
- Ghosh, P., Kim, A. I., and Hatfull, G. F. 2003. *Mol. Cell* **12**: 1101-1111.
- Guérardel, Y., Maes, E., Ellass, E., Leroy, Y., Timmerman, P., Besra, G. S., Loch, C., Strecker, G., and Kremer, L. 2002. *J. Biol. Chem.* **277**: 30635-30648.
- Guérardel, Y., Maes, E., Briken, V., Chirat, F., Leroy, Y., Loch, C., Strecker, G., and Kremer, L. 2003. *J. Biol. Chem.* **278**: 36637-36651.
- Hall-Stoodley, L., and Stoodley, P. 2005. *Trends Microbiol.* **13**: 7-10.
- Hayashi, T., Yamamoto, O., Sasaki, H., Kawaguchi, A., and Okazaki, H. 1983. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**: 1108-1113.
- Kaur, D., Lowary, T. L., Vissa, V. D., Crick, D. C., and Brennan, P. J. 2002. *Microbiology*. **148(Pt 10)**: 3049-3057.
- Kindler, V., Sappino, A. P., Grau, G. E., Piguet, P. F., and Vassalli, P. 1989. *Cell* **56**: 731-740.
- Kohler, S., Delwiche, C. F., Denny, P. W., Tilney, L. G., Webster, P., Wilson, R. J., Palmer, J. D., and Roos, D. S. 1997. *Science* **275**: 1485-1489.
- Kremer, L., and Besra, G. S. 2002. *Expert Opin. Investig. Drugs* **11**: 1033-1049.
- Mdluli, K., Slayden, R. A., Zhu, Y., Ramaswamy, S., Pan, X., Mead, D., Crane, D. D., Musser, J. M., and Barry, C. E. III. *Science* **280**: 1607-1610.
- Nagase, H. and Woessner, J. F., Jr. 1999. *J. Biol. Chem.* **274**: 21491-21494.
- Nigou, J., Gilleron, M., and Puzo, G. 2003. *Biochimie* **85**: 153-166.
- Nkrumah, L. J., Muhle, R. A., Moura, P. A., Ghosh, P., Hatfull, G. F., Jacobs, W. R., Jr., and Fidock, D. A. 2006. *Nat. Methods* **3**: 615-621.
- Price, N. M., Gilman, R. H., Uddin, J., Recavarren, S., and Friedland, J. S. 2003. *J. Immunol.* **171**: 5579-5586.
- Primm, T. P., Lucero, C. A., and Falkinham, J. O., 3rd. 2004. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 98-106.
- Recht, J., and Kolter, R. 2001. *J. Bacteriol.* **183**: 5718-5724.
- Slayden, R. A., Lee, R. E., Armour, J. W., Cooper, A. M., Orme, I. M., Brennan, P. J., and Besra, G. S. 1996. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 2813-2819.
- Waller, R. F., Keeling, P. J., Donald, R. G., Striepen, B., Handman, E., Lang-Unnasch, N., Cowman, A. F., Besra, G. S., Roos, D. S., and McFadden, G. I. 1998. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 12352-12357.
- Shawver, L. K., Slamon, D., and Ullrich, A. 2002 *Cancer Cell* **1** : 117-123.
- Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., and Pieters, J. 2004. *Science* **304** : 1800-1804.
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., and Cole, S. 1992. *Nature* **358**: 591-593.

Sélection de 10 Publications