

## 2

## Approches moléculaires de la tuberculose

Malgré la multitude de connaissances acquises depuis 120 ans sur *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), l'agent étiologique de la tuberculose humaine, découvert par Robert Koch en 1881, la tuberculose reste la première cause de mortalité par maladie transmissible en ce début du XIX<sup>e</sup>-siècle dans le monde. Pour améliorer cette situation, il est nécessaire non seulement de mieux utiliser les moyens thérapeutiques et préventifs actuellement disponibles, mais également de développer de nouveaux vaccins et de nouveaux agents antituberculeux. L'étude moléculaire de *M. tuberculosis* et de la souche vaccinale actuelle, le bacille de Calmette et Guérin (BCG), est d'une importance majeure.

L'ADN de *M. tuberculosis* présente plus de 99,9 % d'identité avec celui des autres membres du complexe de bacilles tuberculeux : *M. bovis*, l'agent de la tuberculose bovine ; *M. bovis* BCG, la souche vaccinale dérivée de *M. bovis* ; *M. africanum*, un pathogène de l'homme d'origine africaine ; *M. canettii*, un bacille tuberculeux atypique chez l'homme et *M. microti*, responsable de la tuberculose chez certains rongeurs.

La connaissance de la génétique des mycobactéries a beaucoup progressé ces dernières années grâce au développement de nouveaux outils (Pelicic et coll., 1997 ; Braunstein et coll., 2002) et au décryptage de la séquence du génome de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole et coll., 1998). De ce fait, et contrairement à la situation rencontrée dans les années 1970-80, les mycobactéries se trouvent parmi les bactéries les mieux caractérisées sur le plan génétique. Actuellement, nous disposons de la séquence complète de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole et coll., 1998), *M. tuberculosis* CDC1551 (Fleischmann et coll., 2002), *M. bovis* AF2122 (Garnier et coll., 2003) et *M. leprae* (Cole et coll., 2001). Les séquençages de *M. bovis* BCG, *M. microti*, *M. avium*, *M. tuberculosis* Beijing 210, *M. smegmatis* et *M. paratuberculosis* sont sur le point d'aboutir. Les travaux génétiques et génomiques sur *M. tuberculosis* et sur d'autres mycobactéries ont donc permis de recueillir d'innombrables informations sur l'organisation génétique des mycobactéries. Ces données génétiques ont, de plus, apporté des éléments clés dans la compréhension des mécanismes moléculaires mis en jeu par *M. tuberculosis* pour infecter l'hôte mais aussi dans l'effet protecteur du vaccin BCG.

## Bases moléculaires de la pathogénicité

Contrairement aux autres bactéries pathogènes, *M. tuberculosis* ne possède pas de facteur de virulence classique, de type toxine. Chez l'homme, *M. tuberculosis* utilise l'appareil respiratoire comme principale voie d'entrée. Il résiste à la dégradation par les macrophages alvéolaires, dans lesquels il est capable de se multiplier (Russell, 2001). Un des éléments cruciaux pour la survie de *M. tuberculosis* dans les phagosomes des macrophages est sa capacité à en diminuer l'acidification, ce qui a pour conséquence de bloquer ou de retarder la fusion du phagosome avec le lysosome (Goren et coll., 1976 ; Anes et coll., 2003). Au niveau moléculaire, ce phénomène n'est pas clairement élucidé, la détermination des mécanismes impliqués constitue un des enjeux majeurs de la recherche dans ce domaine (Russell, 2001). La réponse immunitaire de l'hôte contrôle la sévérité de l'infection par *M. tuberculosis*. Cette réponse immunitaire met en jeu la voie Th1, qui recrute des cellules dendritiques, des macrophages et des lymphocytes de type CD4 et CD8 (Kaufmann, 2001). Les bases moléculaires de la pathogénicité sont donc multifactorielles, impliquant à la fois la bactérie et l'hôte.

Plusieurs approches ont été utilisées pour déterminer les bases moléculaires du pouvoir pathogène de *M. tuberculosis*. Un vecteur thermosensible, dérivé du plasmide pAL5000 de *M. fortuitum* et contenant le gène *sacB* (vecteur ts/sacB), a été utilisé pour sélectionner des événements génétiques rares se produisant chez les mycobactéries, en particulier chez les espèces appartenant au complexe de *M. tuberculosis*. Ce vecteur a servi à provoquer des échanges alléliques conduisant à l'inactivation d'un certain nombre de gènes potentiellement impliqués dans la virulence ou le maintien intracellulaire. Une telle approche a permis d'isoler un mutant de la souche de *M. tuberculosis* possédant le gène codant pour le régulateur putatif PhoP inactivé par insertion. Ce gène, proche du gène putatif *phoR*, est essentiel à la multiplication de *M. tuberculosis* dans des macrophages de souris en culture et chez la souris principalement au niveau du poumon (Perez et coll., 2001). Ce même vecteur (ts/sacB) en combinaison avec un transposon marqué a également permis d'utiliser la méthode STM (*signature-tagged transposon mutagenesis*) pour rechercher directement chez la souris des souches atténuées pour la virulence. Quatre mutants ont ainsi été trouvés dans une région génétique de cinquante kilobases regroupant 13 gènes impliqués dans la synthèse et le transport des dimycosérosates de phtiocérols. Le défaut de synthèse ou de transport de ces lipides complexes affecte la perméabilité et la structure de l'enveloppe mycobactérienne et ainsi la virulence des bactéries (Camacho et coll., 1999). L'utilisation des mycobactériophages a permis d'isoler de nombreux mutants possédant des gènes inactivés par insertion ou délétion (Braunstein et coll., 2003). Grâce à cette approche, l'importance de la synthèse et du transport des dimycosérosates de phtiocérols pour la virulence de *M. tuberculosis* a été confirmée (Cox et coll., 1999).

**Tableau 2.1 : Classification des mutants de *M. tuberculosis* décrits (d'après Hingley-Wilson et coll., 2003)**

Classe	Mutants de <i>M. tuberculosis</i>	Fonction du gène
sgiv	<i>leuD</i> (Hondalus et coll., 2000) <i>lysA</i> (Pavelka et coll., 2003) <i>mgt</i> (Buchmeier et coll., 2000) <i>proC</i> (Smith et coll., 2001) <i>trpD</i> (Smith et coll., 2001) <i>purC</i> (Jackson et coll., 1999)	Synthèse de leucine Synthèse de lysine Transport du magnésium Synthèse de proline Synthèse de tryptophane Synthèse de purine
giv	<i>erp</i> (Berthet et coll., 1998a) <i>phoP</i> (Perez et coll., 2001) <i>secA2</i> (Braunstein et coll., 2003) <i>fadD28</i> , <i>mmpL7</i> (Camacho et coll., 1999 ; Cox et coll., 1999) <i>glnA1</i> (Tullius et coll., 2003) <i>panCD</i> (Sambandamurthy et coll., 2002)	<i>Exported repetitive protein</i> (fonction inconnue) <i>Two-component regulatory protein</i> Facteur de sécrétion accessoire (sécrète SOD) Synthèse et transport de PDIM Glutamine synthétase (métabolisme de l'azote) Synthèse de pantothénate
per	<i>pcaA</i> (Glickman et coll., 2000) <i>icl</i> (McKinney et coll., 2000) <i>plcABCD</i> (Raynaud et coll., 2002) <i>relMTB</i> (Dahl et coll., 2003) <i>dnaE2</i> (Boshoff et coll., 2003) <i>hsp70</i> (Stewart et coll., 2001)	<i>Proximal cyclopropanation of a-mycolates</i> Isocitrate lyase Phospholipase C Synthèse et hydrolyse de (p)ppGpp ADN polymérase Hsp70
pat	<i>sigH</i> (Kaushal et coll., 2002) <i>rpoV(sigA)/whiB3</i> (Steyn et coll., 2002)	Facteur sigma H Facteur sigma A et facteur de transcription putatif
dis	<i>hbhA</i> (Pethe et coll., 2001)	Hémagglutinine liant l'héparine

SOD : superoxyde dismutase ; PDIM : *phthiosterol dimycocerosate* ; (p)ppGpp : *hyperphosphorylated guanine nucleotides*

Les mutants de *M. tuberculosis* affectés dans leur pouvoir pathogène sont indiqués dans le tableau 2.1 (Hingley-Wilson et coll., 2003). Ces auteurs ont classé les mutations en 5 groupes selon leurs effets sur la viabilité de la bactérie *in vitro* :

- le premier groupe comprend les mutations dans des gènes de *M. tuberculosis* qui affectent très sévèrement la viabilité *in vivo*. Initialement, ces souches avaient été considérées comme de bons candidats vaccins, ceci en raison de leur niveau d'atténuation permettant de les utiliser chez les individus immunodéprimés. Néanmoins, la capacité à se répliquer est requise pour l'induction d'une immunité protectrice ;
- dans le deuxième groupe, la virulence de *M. tuberculosis* est moins affectée que dans le premier groupe ;
- le troisième groupe comprend des mutants qui sont modifiés dans leur capacité à persister chez l'hôte ;
- les mutants du quatrième groupe induisent des pathologies moins prononcées ;
- les mutants du cinquième groupe sont incapables de dissémination chez l'hôte.

L'étude approfondie de ces mutants permet désormais de mieux comprendre les mécanismes employés par *M. tuberculosis* pour se multiplier et persister chez son hôte. La connaissance de ces mécanismes est essentielle pour le développement de stratégies nouvelles de lutte contre cette bactérie. De plus, certains de ces mutants sont actuellement l'objet d'intenses recherches dans le but de les utiliser comme des souches vaccinales atténuées<sup>1</sup>.

### **Apport de la génomique et de la génomique fonctionnelle pour le traitement et la prévention**

La génomique, c'est-à-dire l'identification systématique de tous les gènes d'une cellule par séquençage de l'ADN et analyse bioinformatique, ainsi que la génomique comparative permettent d'envisager de nouvelles cibles potentielles pour de nouveaux agents bactéricides. Dans le cas de *M. tuberculosis*, le séquençage et l'analyse systématique du génome de la souche H37Rv ont été entrepris dans un travail collaboratif entre l'Institut Pasteur de Paris et le Centre Sanger de Hinxton (Cambridge, Grande Bretagne). Le séquençage du génome a permis de mettre en évidence que le chromosome de *M. tuberculosis* est circulaire et qu'il contient 4 411 529 paires de bases avec un pourcentage de bases GC d'environ 65,6. De plus, l'analyse bioinformatique a conduit à prédire que 3 924 gènes codent pour des protéines. La fonction est partiellement ou totalement élucidée pour respectivement 20 % et 40 % de ces gènes, tandis qu'aucune information n'a pu être obtenue pour les 40 % restants (Cole et coll., 1998 ; Camus et coll., 2002).

L'analyse du génome de *M. tuberculosis* a également permis d'identifier plusieurs nouvelles familles de gènes précédemment inconnues, comme par exemple les gènes codant pour les protéines PE et PPE, qui occupent 10 % du génome. Ces protéines sont caractérisées par des motifs de proline-acide glutamique ou proline-proline-acide glutamique typiques, situés dans la partie aminoterminal, et par des régions centrales et carboxyterminales répétitives, très riches en glycine pour les PE et en asparagine pour les PPE. La fonction de ces protéines est actuellement inconnue, mais leur abondance suggère qu'elles ont un rôle important dans la biologie de *M. tuberculosis* (Cole et coll., 1998 ; Brennan et Delogu, 2002). Les protéines PE et PPE sont de ce fait considérées comme des cibles potentiellement intéressantes pour le développement de nouvelles thérapies.

L'analyse du génome a aussi indiqué que 14 gènes *esx* codant pour les protéines de la famille ESAT-6 sont présents dans 11 régions différentes (Cole et coll., 1998 ; Tekaia et coll., 1999). ESAT-6, une petite protéine

codée par le gène *esxA* de cette famille, est un antigène protéique apparemment sécrété selon un mécanisme ne faisant pas intervenir un peptide signal (Berthet et coll., 1998b). Cet antigène est fortement reconnu par les lymphocytes T humains et provoque une production massive d'IFN- $\gamma$  (Sorensen et coll., 1995). Des études récentes ont montré que certains membres de la famille ESAT-6 sont impliqués dans le pouvoir pathogène de *M. tuberculosis* (Pym et coll., 2002 ; Lewis et coll., 2003). Lors des études de génomique comparative employant différentes techniques d'hybridation, plusieurs régions de différence (RD1-RD14), codant pour environ 140 protéines, ont été trouvées absentes chez *M. bovis* BCG, la souche vaccinale, par rapport à la souche virulente *M. tuberculosis* H37Rv. Ces résultats permettent d'étudier de façon approfondie les différences génétiques potentiellement impliquées dans la virulence de certains membres du complexe. Par exemple, la région RD1, qui contient le gène *esxA*, est la seule région absente dans les souches atténuées *M. bovis* BCG, et *M. microti* (Mahairas et coll., 1996 ; Brodin et coll., 2002 ; Brosch et coll., 2002), mais elle est présente chez tous les autres membres du complexe. Comme le BCG, la plupart des souches de *M. microti* sont inoffensives pour l'homme. Ainsi, *M. microti* a été utilisée comme vaccin dans les années 1960 en Tchécoslovaquie (Sula et Radkovsky, 1976) et a fait l'objet de larges essais cliniques au Royaume-Uni (Hart et Sutherland, 1977). Lors de la réintroduction de la région RD1 par complémentation dans le BCG et dans *M. microti*, la virulence de ces deux souches vaccinales est partiellement restaurée chez la souris immunodéprimée. En revanche, la réintroduction de cinq autres régions de différence (RD3, RD4, RD5, RD7 et RD9), suspectées d'être impliquées dans la virulence, ne semble pas avoir d'effet sur le pouvoir pathogène de ces deux souches (Pym et coll., 2002). Comme la région RD1 comprend aussi le gène codant pour l'antigène protéique ESAT-6, il est maintenant évident que toutes les souches vaccinales employées à grande échelle dans l'histoire de la vaccination contre la tuberculose étaient dépourvues de cet antigène, qui est immunodominant et semble diriger la réponse immunitaire de l'hôte vers la voie Th1, entraînant la production d'IFN- $\gamma$ . En effet, l'expression de cet antigène dans le contexte d'un BCG recombinant, ainsi que celle d'autres protéines de la région RD1 impliquées dans la sécrétion d'ESAT-6, augmente l'efficacité du BCG vis-à-vis d'une inoculation (*challenge*) avec *M. tuberculosis* dans différents modèles animaux (Pym et coll., 2003). Dès lors, les protéines de la région RD1 sont considérées comme des cibles potentiellement très intéressantes dans la prévention (antigène protecteur), le diagnostic (remplaçant le PPD – épreuve à la tuberculine –) et la thérapie (cible de médicament), comme en témoignent les nombreuses publications parues récemment sur ce sujet (Doherty et coll., 2002 ; Pym et coll., 2002 ; Renshaw et coll., 2002 ; Hsu et coll., 2003 ; Lewis et coll., 2003 ; Pollock et coll., 2003 ; Pym et coll., 2003 ; Rolinck-Werninghaus et coll., 2003 ; Stanley et coll., 2003 ; Guinn et coll., 2004).

De plus, des études concernant la présence ou de l'absence des régions RD chez un plus grand nombre de souches du complexe *M. tuberculosis* ont montré que ces régions étaient également absentes chez d'autres membres du complexe. Ces études ont permis de définir des relations phylogénétiques entre les différents membres du complexe (figure 2.1) et de proposer un nouveau schéma de l'évolution des bacilles tuberculeux, remettant en question l'hypothèse actuelle selon laquelle *M. bovis* serait l'ancêtre de *M. tuberculosis* (Brosch et coll., 2002 ; Mostowy et coll., 2002). Le séquençage de *M. tuberculosis* H37Rv est en faveur de cette hypothèse. Ces différents travaux font des mycobactéries les bactéries les mieux caractérisées sur le plan génétique. L'ensemble de ces informations est donc disponible pour identifier de nouvelles cibles potentielles de médicaments antituberculeux.

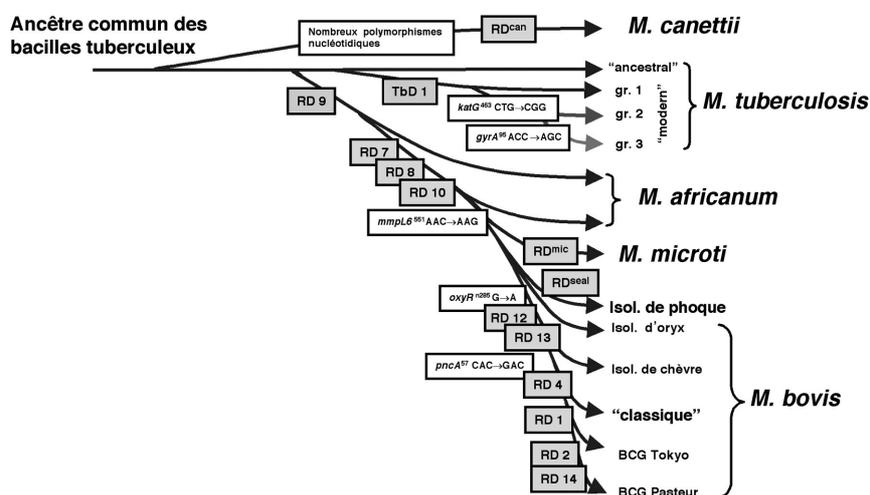


Figure 2.1 : Arbre phylogénique des membres du complexe *M. tuberculosis* (d'après Brosch et coll., 2002)

C'est dans cette perspective que la séquence génomique de *M. leprae* a une valeur toute particulière. Comme le chromosome de *M. tuberculosis*, celui de *M. leprae*, l'agent étiologique de la lèpre, est circulaire. En revanche, il ne contient que 3 268 203 paires de bases et seulement 1 605 gènes codent pour des protéines (Cole et coll., 2001). Chez *M. leprae*, 49,5 % du génome représentent des phases de lectures codantes ; parmi les 50,5 % restants, 27 % sont des pseudogènes, identifiés grâce à la comparaison de séquences *in silico* avec le génome de *M. tuberculosis*, chez qui les gènes correspondants semblent encore parfaitement fonctionnels. Le chromosome de *M. leprae* contient 1 116 pseudogènes et 1 605 gènes potentiellement actifs organisés en clusters flanqués de longues régions non codantes. La présence de ce nombre important de pseudogènes laisse penser que le génome de *M. leprae* a subi une évolution réductive aboutissant à la diminution de taille du génome et à la

perte de certains gènes, et donc de certaines fonctions. Il est probable que la perte du matériel génétique ait lieu au cours d'un changement de mode de vie des bactéries. Ainsi, certaines bactéries environnementales comme *M. smegmatis* (taille de génome 7 Mb) ont un génome plus grand que certains pathogènes intracellulaires tels que *M. tuberculosis* (taille de génome 4,4 Mb) ou *M. leprae* (taille de génome 3,2 Mb) (Brosch et coll., 2001). En fait, lors du cycle de vie intracellulaire, certains éléments essentiels pour la survie de la bactérie dans un environnement extracellulaire ne le sont plus, car des substances équivalentes sont fournies par la cellule hôte. Ceci pourrait expliquer l'élimination de certaines fonctions par accumulation de mutations dans les gènes qui ne sont plus objets de contre-sélection. Pour *M. leprae*, l'évolution réductive du génome est particulièrement impressionnante. Au final, *M. leprae* aurait perdu approximativement 2 000 gènes, l'évolution réductive aurait sélectionné naturellement au cours du temps les gènes indispensables à la survie de cette mycobactérie intracellulaire. Cette sélection naturelle est primordiale pour déterminer les gènes essentiels des mycobactéries.

Grâce au jeu de données fournies par les diverses séquences, il est possible de distinguer les gènes communs aux mycobactéries de ceux qui sont limités à une espèce mycobactérienne donnée. De plus, les séquences complètes ou partielles des génomes d'environ 200 espèces chez les bactéries et les organismes eucaryotes sont également disponibles<sup>2</sup> pour réaliser des recherches de similarité de séquence. Ces comparaisons de séquences *in silico* sont importantes pour évaluer si les nouveaux agents thérapeutiques potentiels inhibent bien des fonctions essentielles, spécifiquement bactériennes, limitant ainsi l'apparition d'effets secondaires chez l'homme. Il est désormais possible d'effectuer un criblage *in silico* de la séquence génomique humaine afin de s'assurer qu'il n'existe aucune protéine ou gène apparenté(e) chez l'hôte. Des criblages similaires dans les séquences génomiques d'autres pathogènes sont également réalisables pour évaluer le spectre, voire la spécificité, de nouvelles cibles.

Grâce à la séquence complète du génome de *M. tuberculosis* H37Rv, de nombreux progrès ont été faits dans d'autres disciplines ; l'établissement de la carte du transcriptome du bacille tuberculeux (Wilson et coll., 1999) et une description détaillée du protéome sont disponibles (Jungblut et coll., 1999). Ces derniers travaux ont permis, grâce à l'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines dérivées de *M. tuberculosis* et de souches de BCG cultivées dans différentes conditions, de détecter environ la moitié des quelque 4 000 polypeptides prédits d'après la séquence du génome. De plus, les puces à ADN s'avèrent être de puissants outils pour sonder la biodiversité et étudier les réponses transcriptionnelles (Behr et coll., 1999 ; Gordon et

2. Génomes disponibles par exemple sur la banque de données en ligne GOLD : *Genome Online Database*, <http://www.genomesonline.org>

coll., 1999 ; Wilson et coll., 1999). Les techniques de double hybride développées chez la levure et chez la bactérie (Karimova et coll., 2002) sont également prometteuses pour l'identification de gènes essentiels. Ces méthodes se montrent efficaces pour mettre en évidence de nouveaux réseaux de protéines et caractériser les interactions protéine-protéine, permettant d'identifier des ligands susceptibles de bloquer la formation de ces complexes (Huang et Schreiber, 1997).

Lorsqu'une cible potentielle de médicament est trouvée, si on parvient à l'obtenir en quantité suffisante, il est alors possible de définir sa structure tridimensionnelle par cristallographie aux rayons X, par RMN ou modélisation moléculaire. Plusieurs grands programmes de la biologie structurale ont été récemment lancés dans le but de déterminer la structure des protéines de mycobactéries<sup>3</sup> (Smith et Sacchettini, 2003). Un criblage virtuel de banques chimiques peut être entrepris dans le but d'identifier de nouveaux inhibiteurs *in silico*. Ces composés sont ensuite co-cristallisés avec la cible afin de mieux comprendre leurs interactions. Les données structurales résultantes peuvent alors être utilisées pour élaborer des inhibiteurs qui se lient de manière plus stable ou forment des liaisons chimiques irréversibles. La mise au point de médicaments à partir de la structure a été utilisée avec un certain succès dans le cas de la protéine InhA de *M. tuberculosis*, une énoyl-ACP réductase impliquée dans la biosynthèse de l'acide mycolique (Banerjee et coll., 1994). Une série d'analogues d'acides gras qui détruisent l'activité enzymatique (Rozwarski et coll., 1998) ont également été synthétisés.

## Relations entre pathogénicité, réponse immune et différents génotypes

La comparaison de la virulence de différentes souches de *M. tuberculosis* a été effectuée en utilisant le modèle souris. Une étude publiée par l'équipe de Kaplan a montré que, comparée à d'autres souches de *M. tuberculosis*, la souche *M. t* HN878 tue les souris plus rapidement. Cette hypervirulence a été attribuée au fait que les lymphocytes T des souris infectées par la souche HN878 produisent moins d'IFN- $\gamma$  que les lymphocytes de souris infectées avec d'autres souches de *M. tuberculosis* (Manca et coll., 2001). Par la suite, la souche HN878 a été identifiée comme appartenant à la famille de *M. tuberculosis* nommée « Beijing ». Les souches de cette famille, initialement isolées en Chine dans la région de Pékin, ont été identifiées par génotypage grâce aux profils typiques des marqueurs moléculaires. Ces souches sont maintenant fréquemment isolées dans de nombreuses régions géographiques du monde. Plus récemment, une équipe hollandaise a également trouvé que les souches de *M. tuberculosis* de la famille Beijing montrent un phénotype

hypervirulent dans son modèle murin (Lopez et coll., 2003). Il reste à déterminer si l'effet protecteur du BCG vis-à-vis des souches de la famille Beijing est inférieur à celui observé vis-à-vis des autres souches de *M. tuberculosis*. De tels effets ont été suggérés sur la base d'observations épidémiologiques (Hermans et coll., 1995) mais les preuves expérimentales n'ont pas été établies à ce jour.

## Bases moléculaires du BCG

Les souches de BCG actuelles dérivent toutes d'une souche atténuée de *M. bovis* que Calmette et Guérin ont obtenue par répliquations en série pendant 13 ans, entre 1909 et 1921. Les passages ultérieurs effectués dans différents laboratoires ont abouti à des souches de BCG présentant à la fois des différences phénotypiques et génotypiques. Ces différentes souches de BCG peuvent aujourd'hui être différenciées des autres membres du complexe *M. tuberculosis* grâce à l'utilisation de marqueurs génétiques spécifiques. Comme nous l'avons décrit en détail dans le paragraphe précédent, lors de la complémentation du BCG avec la région génomique RD1, qui est absente de toutes les souches de BCG, une augmentation de son pouvoir pathogène a été constatée (Pym et coll., 2002). Ceci suggère que la perte de la région RD1 a

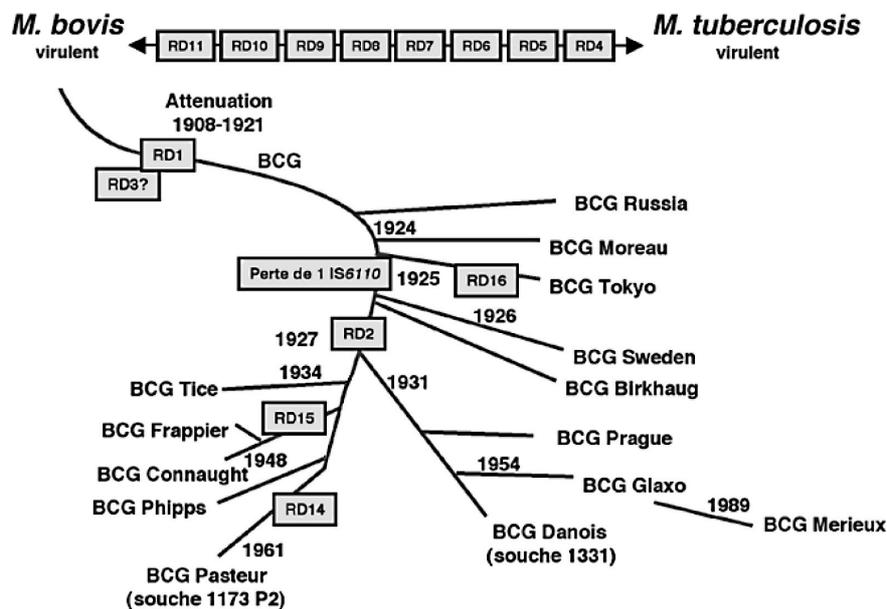


Figure 2.2 : Arbre généalogique des différentes sous-souches de BCG, fondé sur la date de leur distribution et leurs caractéristiques moléculaires (d'après Behr et Small, 1999 et Oettinger et coll., 1999)

été un des événements majeurs qui ont fortement contribué à l'atténuation du BCG. Le fait que cette modification génétique soit observée dans toutes les souches de BCG, avec la même séquence de jonction, suggère que la délétion de RD1 s'est produite pendant les passages en série entre 1909 et 1921, et ce avant toute distribution du BCG dans différents laboratoires du monde (Behr et Small, 1999). Les passages ultérieurs effectués dans ces laboratoires ont entraîné des modifications génétiques supplémentaires, comme des délétions (Mostowy et coll., 2003), des mutations ponctuelles (Behr et coll., 2000) ou des duplications (Brosch et coll., 2000a, 2000b et 2001). L'analyse des modifications génétiques, combinée avec les données historiques sur la distribution des souches de BCG (Behr et coll., 1999 ; Oettinger et coll., 1999), permet aujourd'hui de différencier précisément ces souches de BCG entre elles (figure 2.2) et d'établir un contrôle de qualité moléculaire pour la production de ce vaccin. Ceci pourrait également aider à déterminer si certaines souches de BCG ont un pouvoir protecteur plus important. Cependant, les données bibliographiques actuelles ne permettent pas d'apporter une réponse claire à cette question.

**En conclusion**, la gravité de la situation concernant la tuberculose dans le monde nécessite des moyens extraordinaires. La génomique générale, la génomique comparative et fonctionnelle mycobactérienne ainsi que les disciplines associées ont apporté une masse d'informations nouvelles qui vont contribuer, sans aucun doute, au développement de nouveaux agents antituberculeux et préventifs. Néanmoins, malgré ces avancées impressionnantes, le remplacement du vaccin actuel par de nouveaux vaccins va encore nécessiter de nombreuses années. Une meilleure connaissance des bases moléculaires de *M. tuberculosis* et du BCG est indispensable pour le contrôle de qualité du BCG, l'identification et le typage des souches de *M. tuberculosis* et du BCG, ainsi que pour le diagnostic des infections.

## BIBLIOGRAPHIE

ANES E, KUHNEL MP, BOS E, MONIZ-PEREIRA J, HABERMANN A, GRIFFITHS G. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol* 2003, **5** : 793-802

BANERJEE A, DUBNAU E, QUEMARD A, BALASUBRAMANIAN V, UM KS et coll. InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994, **263** : 227-230

BEHR MA, SMALL PM. A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999, **17** : 915-922

BEHR MA, WILSON MA, GILL WP, SALAMON H, SCHOOLNIK GK et coll. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 1999, **284** : 1520-1523

BEHR MA, SCHROEDER BG, BRINKMAN JN, SLAYDEN RA, BARRY CE 3rd. A point mutation in the *mma3* gene is responsible for impaired methoxymycolic acid production in *Mycobacterium bovis* BCG strains obtained after 1927. *J Bacteriol* 2000, **182** : 3394-3399

BERTHET FX, LAGRANDERIE M, GOUNON P, LAURENT-WINTER C, ENSERGUEIX D et coll. Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. *Science* 1998a, **282** : 759-762

BERTHET FX, RASMUSSEN PB, ROSENKRANDS I, ANDERSEN P, GICQUEL B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 1998b, **144** : 3195-3203

BOSHOFF HI, REED MB, BARRY CE 3rd, MIZRAHI V. DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell* 2003, **113** : 183-193

BRAUNSTEIN M, BARDAROV SS, JACOBS WR Jr. Genetic methods for deciphering virulence determinants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* 2002, **358** : 67-99

BRAUNSTEIN M, ESPINOSA BJ, CHAN J, BELISLE JT, JACOBS WR Jr. SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2003, **48** : 453-464

BRENNAN MJ, DELOGU G. The PE multigene family : a 'molecular mantra' for mycobacteria. *Trends Microbiol* 2002, **10** : 246-249

BRODIN P, EIGLMEIER K, MARMIESSE M, BILLAULT A, GARNIER T et coll. Bacterial artificial chromosome-based comparative genomics identifies *Mycobacterium microti* as a natural ESAT-6 deletion mutant. *Infect Immun* 2002, **70** : 5568-5578

BROSCH R, GORDON SV, PYM A, EIGLMEIER K, GARNIER T, COLE ST. Comparative genomics of the mycobacteria. *Int J Med Microbiol* 2000a, **290** : 143-152

BROSCH R, GORDON SV, BUCHRIESER C, PYM AS, GARNIER T, COLE ST. Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. *Yeast* 2000b, **17** : 111-123

BROSCH R, PYM AS, GORDON SV, COLE ST. The evolution of mycobacterial pathogenicity : clues from comparative genomics. *Trends Microbiol* 2001, **9** : 452-458

BROSCH R, GORDON SV, MARMIESSE M, BRODIN P, BUCHRIESER C et coll. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99** : 3684-3689

BUCHMEIER N, BLANC-POTARD A, EHRT S, PIDDINGTON D, RILEY L, GROISMAN EA. A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* 2000, **35** : 1375-1382

CAMACHO LR, ENSERGUEIX D, PEREZ E, GICQUEL B, GUILHOT C. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 1999, **34** : 257-267

CAMUS JC, PRYOR MJ, MEDIGUE C, COLE ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 2002, **148** : 2967-2973

COLE ST, BROSCH R, PARKHILL J, GARNIER T, CHURCHER C et coll. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998, **393** : 537-544

COLE ST, EIGLMEIER K, PARKHILL J, JAMES KD, THOMSON NR et coll. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001, **409** : 1007-1011

COX JS, CHEN B, MCNEIL M, JACOBS WR Jr. Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Nature* 1999, **402** : 79-83

DAHL JL, KRAUS CN, BOSHOFF HI, DOAN B, FOLEY K et coll. The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100** : 10026-10031

DOHERTY TM, DEMISSIE A, OLOBO J, WOLDAY D, BRITTON S et coll. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients. *J Clin Microbiol* 2002, **40** : 704-706

FLEISCHMANN RD, ALLAND D, EISEN JA, CARPENTER L, WHITE O et coll. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 2002, **184** : 5479-5490

GARNIER T, EIGLMEIER K, CAMUS JC, MEDINA N, MANSOOR H et coll. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100** : 7877-7882

GLICKMAN MS, COX JS, JACOBS WR Jr. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell* 2000, **5** : 717-727

GORDON SV, BROSCH R, BILLAULT A, GARNIER T, EIGLMEIER K, COLE ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol* 1999, **32** : 643-655

GOREN MB, D'ARCY HART P, YOUNG MR, ARMSTRONG JA. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976, **73** : 2510-2514

GUINN KM, HICKEY MJ, MATHUR SK, ZAKEL KL, GROTZKE JE et coll. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2004, **51** : 359-370

HART PD, SUTHERLAND I. BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *BMJ* 1977, **2** : 293-295

HERMANS PW, MESSADI F, GUEBEXABHER H, VAN SOOLINGEN D, DE HAAS PE et coll. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands : usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* 1995, **171** : 1504-1513

HINGLEY-WILSON SM, SAMBANDAMURTHY VK, JACOBS WR Jr. Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol* 2003, **4** : 949-955

HONDALUS MK, BARDAROV S, RUSSELL R, CHAN J, JACOBS WR Jr, BLOOM BR. Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2000, **68** : 2888-2898

HSU T, HINGLEY-WILSON SM, CHEN B, CHEN M, DAI A et coll. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100** : 12420-12425

HUANG J, SCHREIBER SL. A yeast genetic system for selecting small molecule inhibitors of protein-protein interactions in nanodroplets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94** : 13396-13401

JACKSON M, PHALEN SW, LAGRANDERIE M, ENSERGUEIX D, CHAVAROT P et coll. Persistence and protective efficacy of a Mycobacterium tuberculosis auxotroph vaccine. *Infect Immun* 1999, **67** : 2867-2873

JUNGBLUT PR, SCHAIBLE UE, MOLLENKOPF HJ, ZIMNY-ARNDT U, RAUPACH B et coll. Comparative proteome analysis of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG strains : towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol* 1999, **33** : 1103-1117

KARIMOVA G, LADANT D, ULLMANN A. Two-hybrid systems and their usage in infection biology. *Int J Med Microbiol* 2002, **292** : 17-25

KAUFMANN SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis ? *Nat Rev Immunol* 2001, **1** : 20-30

KAUSHAL D, SCHROEDER BG, TYAGI S, YOSHIMATSU T, SCOTT C et coll. Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a Mycobacterium tuberculosis mutant lacking alternative sigma factor, SigH. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99** : 8330-8335

LEWIS KN, LIAO R, GUINN KM, HICKEY MJ, SMITH S et coll. Deletion of RD1 from Mycobacterium tuberculosis mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis* 2003, **187** : 117-123

LOPEZ B, AGUILAR D, OROZCO H, BURGER M, ESPITIA C et coll. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003, **133** : 30-37

MAHAIRAS GG, SABO PJ, HICKEY MJ, SINGH DC, STOVER CK. Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis. *J Bacteriol* 1996, **178** : 1274-1282

MANCA C, TSENOVA L, BERGTOLD A, FREEMAN S, TOVEY M et coll. Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98** : 5752-5757

MCKINNEY JD, HONER ZU BENTRUP K, MUNOZ-ELIAS EJ, MICZAK A, CHEN B et coll. Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 2000, **406** : 735-738

MOSTOWY S, COUSINS D, BRINKMAN J, ARANAZ A, BEHR MA. Genomic deletions suggest a phylogeny for the Mycobacterium tuberculosis complex. *J Infect Dis* 2002, **186** : 74-80

MOSTOWY S, TSOLAKI AG, SMALL PM, BEHR MA. The in vitro evolution of BCG vaccines. *Vaccine* 2003, **21** : 4270-4274

OETTINGER T, JORGENSEN M, LADEFOGED A, HASLOV K, ANDERSEN P. Development of the Mycobacterium bovis BCG vaccine : review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tuber Lung Dis* 1999, **79** : 243-250

PAVELKA MS Jr, CHEN B, KELLEY CL, COLLINS FM, JACOBS WR Jr. Vaccine efficacy of a lysine auxotroph of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun* 2003, **71** : 4190-4192

PELICIC V, JACKSON M, REYRAT JM, JACOBS WR Jr, GICQUEL B, GUILHOT C. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, **94** : 10955-10960

PEREZ E, SAMPER S, BORDAS Y, GUILHOT C, GICQUEL B, MARTIN C. An essential role for phoP in Mycobacterium tuberculosis virulence. *Mol Microbiol* 2001, **41** : 179-187

PETHE K, ALONSO S, BIET F, DELOGU G, BRENNAN MJ et coll. The heparin-binding haemagglutinin of M. tuberculosis is required for extrapulmonary dissemination. *Nature* 2001, **412** : 190-194

POLLOCK JM, MCNAIR J, BASSETT H, CASSIDY JP, COSTELLO E et coll. Specific delayed-type hypersensitivity responses to ESAT-6 identify tuberculosis-infected cattle. *J Clin Microbiol* 2003, **41** : 1856-1860

PYM AS, BRODIN P, BROSCHE R, HUERRE M, COLE ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti. *Mol Microbiol* 2002, **46** : 709-717

PYM AS, BRODIN P, MAJLESSI L, BROSCHE R, DEMANGEL C et coll. Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med* 2003, **9** : 533-539

RAYNAUD C, GUILHOT C, RAUZIER J, BORDAT Y, PELICIC V et coll. Phospholipases C are involved in the virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* 2002, **45** : 203-217

RENSHAW PS, PANAGIOTIDOU P, WHELAN A, GORDON SV, HEWINSON RG et coll. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the Mycobacterium tuberculosis complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1 :1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6\*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. *J Biol Chem* 2002, **277** : 21598-21603

ROLINCK-WERNINGHAUS C, MAGDORF K, STARK K, LYASHCHENKO K, GENNARO ML et coll. The potential of recombinant antigens ESAT-6, MPT63 and mig for specific discrimination of Mycobacterium tuberculosis and M. avium infection. *Eur J Pediatr* 2003, **162** : 534-536

ROZWARSKI DA, GRANT GA, BARTON DH, JACOBS WR Jr, SACCHETTINI JC. Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from Mycobacterium tuberculosis. *Science* 1998, **279** : 98-102

RUSSELL DG. Mycobacterium tuberculosis : here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2** : 569-577

SAMBANDAMURTHY VK, WANG X, CHEN B, RUSSELL RG, DERRICK S et coll. A pantothenate auxotroph of Mycobacterium tuberculosis is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. *Nat Med* 2002, **8** : 1171-1174

- SMITH DA, PARISH T, STOKER NG, BANCROFT GJ. Characterization of auxotrophic mutants of *Mycobacterium tuberculosis* and their potential as vaccine candidates. *Infect Immun* 2001, **69** : 1142-1150
- SMITH CV, SACCHETTINI JC. *Mycobacterium tuberculosis* : a model system for structural genomics. *Curr Opin Struct Biol* 2003, **13** : 658-664
- SORENSEN AL, NAGAI S, HOUEM G, ANDERSEN P, ANDERSEN AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995, **63** : 1710-1717
- STANLEY SA, RAGHAVAN S, HWANG WW, COX JS. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100** : 13001-13006
- STEWART GR, SNEWIN VA, WALZL G, HUSSELL T, TORMAY P et coll. Overexpression of heat-shock proteins reduces survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the chronic phase of infection. *Nat Med* 2001, **7** : 732-737
- STEYN AJ, COLLINS DM, HONDALUS MK, JACOBS WR Jr, KAWAKAMI RP, BLOOM BR. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with RpoV to affect host survival but is dispensable for in vivo growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99** : 3147-3152
- SULA L, RADKOVSKY I. Protective effects of *M. microti* vaccine against tuberculosis. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1976, **20** : 1-6
- TEKAIA F, GORDON SV, GARNIER T, BROSCHE R, BARRELL BG, COLE ST. Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. *Tuber Lung Dis* 1999, **79** : 329-342
- TULLIUS MV, HARTH G, HORWITZ MA. Glutamine synthetase GlnA1 is essential for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human THP-1 macrophages and guinea pigs. *Infect Immun* 2003, **71** : 3927-3936
- WILSON M, DERISI J, KRISTENSEN HH, IMBODEN P, RANE S et coll. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, **96** : 12833-12838