

L'utilisation des souris déficientes en MyD88 nous permet donc de séparer plusieurs aspects de la réponse immunitaire innée aux mycobactéries conduisant, d'une part, à la production de cytokines pro-inflammatoires et de nitrites, qui semble essentielle pour la réponse rapide aux mycobactéries virulentes telle que *M. tb* [11], mais n'est pas indispensable au contrôle de la souche atté-

nuée *M. bovis* BCG [10] et, d'autre part, à l'expression par les cellules présentatrices de l'antigène des molécules de co-stimulation, qui permet la mise en place de la réponse adaptative, et semble largement indépendante des voies TLR et MyD88 [10, 11]. ♦

Fatal tuberculosis despite adaptive immune response in the absence of MyD88

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par le CNRS, la Fondation de la Recherche Médicale, le Studium, Orléans, et un contrat de collaboration franco-sud-africain.

RÉFÉRENCES

1. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995 ; 2 : 561-72.
2. Jacobs M, Marino MW, Brown N, et al. Correction of defective host response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in TNF-deficient mice by bone marrow transplantation. *Lab Invest* 2000 ; 80 : 901-14.
3. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997 ; 388 : 394-7.
4. Abel B, Thiebemont N, Quesniaux VJ, et al. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol* 2002 ; 169 : 3155-62.
5. Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, et al. Cutting edge : Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2002 ; 169 : 3480-4.

6. Sugawara I, Yamada H, Li C, et al. Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiol Immunol* 2003 ; 47 : 327-36.
7. Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Pathol* 2004 ; 164 : 49-57.
8. Fremont CMC, Nicolle DMM, Torres DS, Quesniaux VJ. Control of *Mycobacterium bovis* BCG infection with increased inflammation in TLR4-deficient mice. *Microbes Infect* 2003 ; 5 : 1070.
9. Nicolle D, Fremont C, Pichon X, et al. Long-term control of *Mycobacterium bovis* BCG infection in the absence of Toll-like receptors (TLRs) : Investigation of TLR2-, TLR6-, or TLR2-TLR4-deficient mice. *Infect Immun* 2004 ; 72 : 6994-7004.
10. Nicolle DM, Pichon X, Bouchot A, et al. Chronic pneumonia despite adaptive immune response to *Mycobacterium bovis* BCG in MyD88-deficient mice. *Lab Invest* 2004 ; 84 : 1305-21.
11. Fremont CM, Yermeev V, Nicolle DM, et al. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J Clin Invest* 2004 ; 114 : 1790-9.
12. Doherty TM, Arditi M. TB, or not TB : That is the question - Does TLR signaling hold the answer ? *J Clin Invest* 2004 ; 114 : 1699-703.
13. Means TK, Wang S, Lien E, et al. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999 ; 163 : 3920-7.
14. Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torres D, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol* 2004 ; 172 : 4425-34.
15. Yamada H, Mizumo S, Horai R, et al. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 α/β double-knockout mice. *Lab Invest* 2000 ; 80 : 759-67.
16. Juffermans NP, Florquin S, Camoglio L, et al. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 2000 ; 182 : 902-8.
17. Sugawara I, Yamada H, Kaneko H, et al. Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. *Infect Immun* 1999 ; 67 : 2585-9.

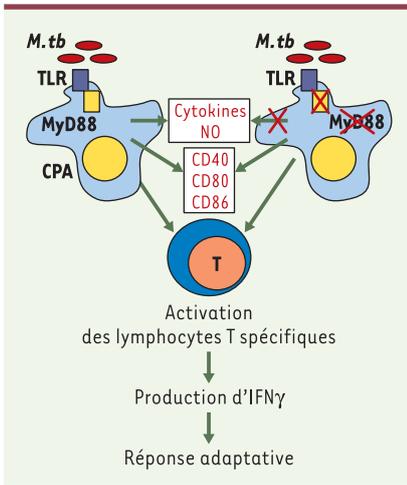


Figure 2. Schéma des résultats expérimentaux obtenus chez des souris déficientes en MyD88 après infection par *Mycobacterium tuberculosis*. L'absence de MyD88 abolit la production de cytokines et de monoxyde d'azote (NO) par les cellules présentatrices d'antigène (CPA), mais pas l'expression des molécules de co-stimulation ni la mise en place de la réponse adaptative.

NOUVELLE

Dopage dans le peloton des antituberculeux

Alain R. Baulard

► On l'a cru longtemps en régression, l'Organisation Mondiale de la Santé avait prévu son éradication à l'aube du 3^e millénaire ; pourtant, la tuberculose est aujourd'hui l'une des premières causes de mortalité à l'échelle de la planète, tuant chaque année plus de deux

millions de personnes. Cette maladie est particulièrement contagieuse, puisqu'un tiers de la population mondiale est actuellement porteur de *Mycobacterium tuberculosis*. On estime que 10% des personnes infectées développeront la

Inserm U.629, Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1, rue du Professeur Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France.
alain.baulard@pasteur-lille.fr

maladie au cours de leur vie, ce qui représente plus de 200 millions de malades potentiels pour les 50 prochaines années. La plupart des malades (90%) habitent les pays de l'Afrique sub-saharienne, du Sud-Est asiatique, en Inde ou en Chine. La pandémie de sida est la meilleure alliée du bacille, puisque 60% des personnes séropositives habitant en Afrique meurent en fait de tuberculose.

Dans l'attente d'une vaccination efficace qui permettrait une prévention à l'échelle mondiale, nous disposons de stratégies thérapeutiques qui présentent malheureusement de plus en plus de failles. Le panel d'antituberculeux est spécifique et très limité car fort peu d'antibiotiques à large spectre sont actifs sur le bacille de Koch. Les traitements sont longs et s'accompagnent d'une pléthore d'effets secondaires, atteignant particulièrement les patients affaiblis par le virus du sida. L'observance des traitements par les malades est donc souvent mise en échec et de nombreux cas de multirésistances apparaissent, essentiellement dans les pays en développement ou émergents, ainsi que dans de nombreux pays industrialisés paupérisés par les crises économiques. Malheureusement, l'identification de nouveaux antituberculeux se fait cruellement attendre. Aucune nouvelle famille d'antituberculeux n'a été commercialisée au cours des 30 dernières années, illustrant la difficulté de la tâche mais aussi le désintérêt global des sociétés industrialisées pour cette problématique. Ainsi, les patients porteurs de souches résistantes aux antibiotiques dits de première intention doivent être traités par une seconde ligne d'antibiotiques particulièrement toxiques. Depuis plusieurs années, notre équipe étudie le mode d'action de l'éthionamide (ETH), l'un de ces antituberculeux de seconde ligne. Nos travaux nous ont conduits à proposer une stratégie qui permet d'augmenter la sensibilité des mycobactéries à cet antibiotique, ce qui pourrait aboutir à une réduction substantielle de la toxicité du traitement antituberculeux tout en conservant son efficacité.

L'ETH est un antibiotique puissant, mais fortement hépatotoxique. Plusieurs antituberculeux comme l'isoniazide, la pirazinamide et l'ETH sont des prodrogues, nécessitant d'être activées pour acquérir leur pouvoir antibactérien. L'activation de l'ETH dépend d'une protéine synthétisée par le bacille tuberculeux, la mono-oxygénase EthA [1]. Cette enzyme transforme la prodrogue ETH en

un dérivé sulfoxyde, qui donnera ensuite le (ou les) composé(s) actif(s) [2]. Dans son état physiologique normal, la mycobactérie produit peu de mono-oxygénase EthA, ce qui limite l'activation de la prodrogue ETH et se traduit par une faible sensibilité de la bactérie à cet antibiotique. Contrôler la production de EthA reviendrait donc à contrôler la sensibilité de la bactérie à l'ETH.

Nous avons récemment montré que la production de la mono-oxygénase EthA est sous le contrôle du répresseur transcriptionnel EthR. De la même façon que le régulateur LacI réprime les gènes de structure de l'opéron lactose, la fixation de EthR sur l'opérateur du gène *ethA* empêche la transcription de ce dernier [3] (Figure 1A). Résolue en collaboration avec les cristallographes V. Villeret et F. Frénois, la structure tridimensionnelle du répresseur EthR a révélé un complexe dimérique typique de la famille des répresseurs transcriptionnels de la famille TetR. De façon inattendue, un ligand enchâssé dans chaque sous-unité du dimère a été identifié lors de cette analyse [4]. Par analogie avec d'autres répresseurs de la famille TetR, nous

avons montré que ce ligand induit une conformation de EthR incompatible avec sa fixation ultérieure à l'ADN. Mimer cette situation *in vivo* aboutirait à la dérégulation du gène *ethA* et donc à une meilleure activation de l'ETH (Figure 1B). Ce ligand co-cristallisé a été purifié, identifié puis resynthétisé, mais l'hydrophobicité élevée de cette molécule la rend faiblement biodisponible.

Poursuivant l'analogie avec le paradigme opératoire *lac* où la lactose est à la fois ligand du répresseur LacI et substrat de la voie de biosynthèse contrôlée par LacI, nous avons postulé que, de la même façon, des substrats physiologiques de EthA pourraient constituer de bons ligands pour EthR. En présence d'un de ces substrats [5], la benzylacétone, la sensibilité de la mycobactérie à l'ETH s'est vue accrue d'environ cinq fois, suggérant que ce composé constitue un ligand efficace de EthR et ainsi inhibe sa fixation à l'opérateur de *ethA* [4]. Déréprimée, la production d'EthA permet dès lors de doper l'activation de l'ETH. Nous tentons actuellement d'identifier des ligands synthétiques de forte affinité pour EthR et co-administrables avec l'ETH. Réduire la

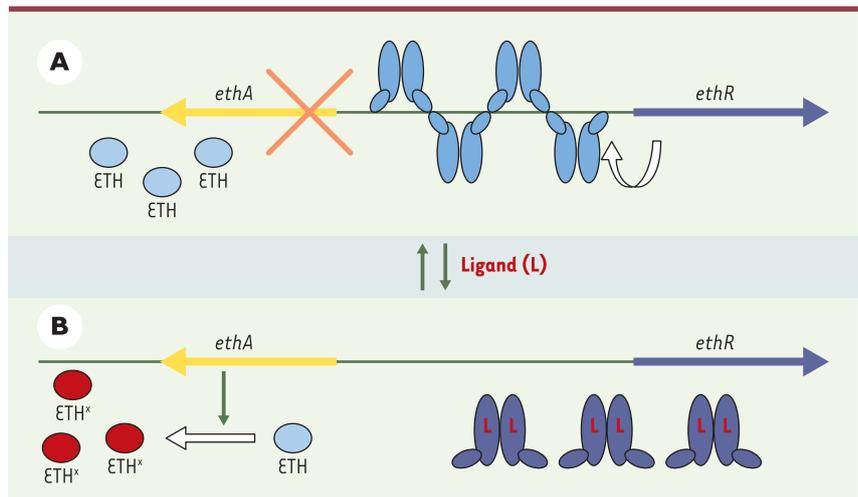


Figure 1. Synergie d'action de l'ETH et d'un ligand d'EthR. **A.** En l'absence de ligand (L), les dimères de répresseur EthR se fixent à l'opérateur de *ethA*, inhibant sa transcription. Sans production de mono-oxygénase EthA, la prodrogue ETH n'est pas transformée en dérivé bactériotoxique. La bactérie est résistante à l'antibiotique. **B.** En présence de ligand (L), les dimères de EthR adoptent une conformation incompatible avec leur fixation à l'ADN. La transcription de *ethA* est libérée et l'enzyme EthA produite active la prodrogue ETH en dérivé bactériotoxique ETH*. La synergie entre l'ETH et le ligand rend la bactérie hypersensible à l'antibiotique.



dose thérapeutique de cet antibiotique devrait ainsi limiter l'apparition des effets hépatotoxiques indésirables lors du traitement de la tuberculose.

EthA est également impliqué dans l'activation d'autres thioamides tels que le prothionamide, le thiacétazone et l'isoxy. Ce dernier composé présente l'intérêt de cibler une lipide-désaturase mycobactérienne, cible non encore exploitée par l'arsenal thérapeutique en usage. Enfin, *Mycobacterium leprae*,

malheureusement résistant à l'isoniazide, est sensible au prothionamide pour lequel une baisse de la dose thérapeutique serait également bienvenue pour éviter les effets secondaires du traitement contre la lèpre. ♦

Doping in the peloton of antituberculosis drugs

RÉFÉRENCES

1. Baulard AR, Betts JC, Engohang-Ndong J, et al. Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in Mycobacteria. *J Biol Chem* 2000; 275: 28326-31.

2. DeBarber AE, Mdluli K, Bosman M, et al. Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9677-82.
3. Engohang-Ndong J, Baillat D, Aumercier M, et al. EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in Mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator. *Mol Microbiol* 2004; 51: 175-88.
4. Frenois F, Engohang-Ndong J, Loch C, et al. Structure of EthR in a ligand bound conformation reveals therapeutic perspectives against tuberculosis. *Mol Cell* 2004; 16: 301-7.
5. Fraaije MW, Kamerbeek NM, Heidekamp AJ, et al. The prodrug activator EtaA from *Mycobacterium tuberculosis* is a Baeyer-Villiger monooxygenase. *J Biol Chem* 2004; 279: 3354-60.

NOUVELLE

Acide lysophosphatidique : un nouveau lien entre plaquettes sanguines et métastases osseuses

Olivier Peyruchaud, Ahmed Boucharaba, Jean-Sébastien Saulnier-Blache, Philippe Clézardin

► La formation de métastases osseuses est une complication fréquente au cours du développement de nombreux cancers (sein, prostate, foie, reins, thyroïde). Les métastases osseuses sont souvent associées à une dégradation du tissu osseux qui est à l'origine de douleurs intenses, d'une élévation de la calcémie et de fractures pathologiques. Ces métastases sont en général très invalidantes et liées à une très forte morbidité [1].

Dans le cas du cancer du sein, les données cliniques et expérimentales actuelles indiquent que les cellules tumorales présentent dans la cavité médullaire produisent un certain nombre de facteurs - protéine apparentée à la parathormone (PTHrP), cytokines - qui stimulent l'activité des ostéoclastes dont la principale fonction est de dégrader l'os. Le tissu osseux étant un réservoir de facteurs de croissance tels que le *transforming growth factor* β (TGF β) et les *insulin like growth factors* (IGF) [2], ces facteurs de croissance sont libérés

de la matrice osseuse au cours de la résorption; ils vont alors stimuler le développement des cellules tumorales ainsi que la production de PTHrP par ces cellules, ce qui va amplifier l'activité de résorption des ostéoclastes. La métastase osseuse est alors le siège d'un cercle vicieux dans lequel la résorption osseuse et le développement tumoral s'entretiennent mutuellement [3]. Les traitements actuels des patients ayant des métastases osseuses, utilisant des inhibiteurs puissants de la résorption osseuse (bisphosphonates), permettent de ralentir la progression de la destruction osseuse mais restent malheureusement inefficaces quant au développement des cellules tumorales présentes sur le site osseux et à l'évolution ultime de ces métastases [4]. L'ensemble de ces données indique que des facteurs endogènes autres que ceux libérés de la matrice osseuse stimulent la croissance des cellules tumorales sur le site métastatique.

O. Peyruchaud,
A. Boucharaba, P. Clézardin:
Inserm U.664; Université
Claude Bernard Lyon 1;
Faculté de Médecine
Laennec, 69372 Lyon Cedex
08, France.
J.S. Saulnier-Blache:
Inserm U.586; Institut Louis
Bugnard; Université Paul
Sabatier,
CHU Rangueil, 31403
Toulouse Cedex 04, France.
peyruchaud@lyon.inserm.fr

L'acide lysophosphatidique (LPA) est un lipide biologiquement actif, présentant une activité de type facteur de croissance *in vitro* (stimulation de la prolifération, migration et invasion cellulaire) [5]. L'implication du LPA dans le processus cancéreux émerge à l'heure actuelle de certaines études. Cependant, son rôle est très mal défini [5]. Dans notre étude, nous présentons des évidences expérimentales démontrant que le LPA, produit par les plaquettes sanguines, stimule la progression des métastases osseuses induites par les cellules de cancer du sein [6]. Nous avons montré que l'activité mitogénique du LPA, sur une série de lignées cellulaires humaines de cancer du sein, était dépendante de la présence des récepteurs du LPA (LPA₁, LPA₂ et LPA₃). À