



HAL
open science

Development of antibacterials directed against the thymidylate synthase ThyX in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanism kinetic and in silico inhibitor optimisation

Kamel Djaout

► To cite this version:

Kamel Djaout. Development of antibacterials directed against the thymidylate synthase ThyX in *Mycobacterium tuberculosis*: mechanism kinetic and in silico inhibitor optimisation. Biochemistry, Molecular Biology. Ecole Polytechnique, 2015. English. NNT: . tel-01873917

HAL Id: tel-01873917

<https://hal.science/tel-01873917v1>

Submitted on 13 Sep 2018

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.



Thèse de doctorat de l'École Polytechnique

Présenté pour obtenir le grade de Docteur de l'École Polytechnique

Discipline : Biologie

Par

Kamel DJAOUT

Titre :

**Développement d'antibactériens dirigés contre la
thymidylate synthase ThyX de *Mycobacterium tuberculosis* :
Cinétique du mécanisme et optimisation *in silico*
d'inhibiteurs.**

Sous la direction de : **Hubert BECKER** et **Hannu MYLLYKALLIO**

Date de soutenance : Jeudi 10 Décembre 2015

Devant le jury composé de :

Dr Eveline LESCRINIER

Rapporteur

Dr Wolfgang Andreas NITSCHKE

Rapporteur

Dr Yap Jean-Bertrand BOUM II

Examineur

Pr Herman VAN TILBEURGH

Examineur

Dr Hubert BECKER

Directeur de thèse

Dr Hannu MYLLYKALLIO

Directeur de thèse

Laboratoire d'Optique et Biosciences

CNRS UMR7645, INSERM U1182, École Polytechnique

Remerciements

Si je dis parfois que « j'ai du mal à me souvenir de ma vie avant le LOB », c'est surtout parce que ces quatre dernières années ont été pour moi parmi les plus enrichissantes, tant sur le plan scientifique que personnel.

Je remercie avant tout Jean-Louis Martin et François Hache pour m'avoir chaleureusement accueillis au Laboratoire d'Optique et Biosciences, en stage de Master 2 d'abord, puis pour ce projet de thèse.

Je ne pourrais mettre un mot sur ma reconnaissance envers mes co-directeurs de thèse Hubert Becker et Hannu Myllykallio pour m'avoir donné une chance et accompagné tout au long de ce travail. Leur pédagogie, bienveillance et exigence m'ont poussé à évoluer et à persévérer. Ils m'ont transmis des valeurs humaines et professionnelles que je tiens aujourd'hui en très haute estime. Enfin, leur humour est inoubliable !

Je remercie Eveline Lescrinier, Herman Van Tilbeurgh, Yap Boum et Wolfgang Nitschke pour avoir accepté de lire ce manuscrit et de participer au jury de soutenance de ma thèse. Leur remarques m'ont permis de porter un regard différent sur mon travail, et de l'enrichir.

Je voudrais remercier Yves Mechulam ainsi que tous les membres du Laboratoire de Biochimie BIOC pour leur chaleureux accueil, et plus

particulièrement Clara Moch, Marc Dauplais et Pierre Plateau pour l'ambiance conviviale de leur salle de manipulation.

Je remercie Ines Gallay à l'I2BC (Paris-Saclay), avec qui j'ai été ravi de pouvoir collaborer, pour son enthousiasme, Veronique Balland pour sa présence et son aide précieuse pendant les jours passés au Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire (Paris VII), et Sophie Bourcier au DCMR (Ecole Polytechnique) qui m'a guidé pendant l'analyse des résultats de spectrométrie de masse.

Cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien de l'ensemble du pôle de biologie avec qui je partage de très bons souvenirs. Une dédicace spéciale à Marten Vos pour ses nombreuses et précieuses explications, son implication et sa bonne humeur. Travailler avec lui a été un plaisir et un honneur. Je remercie également Roxane Lestini, Stéphane Skouloubris et Ursula Liebl pour leurs conseils et leurs encouragements qui m'ont permis, à chaque fois et jusqu'au bout, de prendre plus de recul et de persister. Je remercie Joelle Kuhn qui m'a chaleureusement accueilli dans la dite « salle de biochimie » en janvier 2012, et pour ses coups de gueule formateurs, Latifa Bouzahir pour avoir supporté nos délires dans la bonne humeur. Enfin, et par ordre décroissant de consommation de chocolat (et inversement pour le rhum) : Floriane Delpech et Pierre Sournia, avec qui je ne compte plus les dérapages en fin de journée au laboratoire.

Je remercie Guilhem Gallot, Cédric Bouzigues, Marianne Grognot-Crepy, Jean Marc Sintès et Xavier Solinas pour m'avoir ouvert au monde de l'optique et de la micro fluidique, une expérience que j'ai particulièrement appréciée.

Je pense également à mes complices du bureau en aile 3 que je n'ai pas encore cité : la fée Mouna, Chao, Vincent, Pascal et plus tardivement Yohan qui m'ont vu dans tous mes états ou presque, et réciproquement.

Enfin, je pense à mes parents et à leurs nombreux sacrifices faits au nom de mon éducation ces 27 dernières années, et sans qui je n'écrirai pas ces mots aujourd'hui.

Pour conclure, ces moments passés au LOB n'aurait pas été possibles sans la machine à café de la salle de réunion du LOB. Si ses cafés étaient peu cher, les moments passés dans cette salle avec l'ensemble des membres du laboratoire n'ont pas de prix. Mes pensées vont, dans le désordre, envers Laure et Christelle pour leur généreuse implication dans mon dossier administratif, les actuels et anciens thésardEs et post-docs (Lucille, Nelly, Claire, Lipsa, Olga, Helene, Max, Marco, Stéphane, Louis, Thibault et, last but not least, Guillaume !) pour les pauses et soirées passés en leur délicieuse compagnie, et tous les membres du laboratoire, que je ne cite pas pour ne pas en oublier.

Merci !

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	3
ABREVIATIONS	8
LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES FIGURES.....	10
1. CHAPITRE I – INTRODUCTION	17
1.1 LA TUBERCULOSE.....	17
1.2 LE COMPLEXE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS.....	19
1.3 CYCLE D’INFECTION DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	23
1.4 L’EPIDEMIE ACTUELLE ET SES ENJEUX	27
1.5 LE DEPISTAGE	31
1.6 LE TRAITEMENT PREVENTIF	37
1.7 LES TRAITEMENTS.....	38
MECANISME D’ACTION DES ANTITUBERCULEUX ACTUELS	42
1.8	42
1.9 RESISTANCE AUX TRAITEMENTS.....	48
1.10 LA RECHERCHE D’ANTITUBERCULEUX AUJOURD’HUI.....	52
1.11 MECANISME D’INHIBITION DE LA SYNTHESE DE THYMIDYLATE DANS <i>MTB</i>	56
1.12 LES THYMIDYLATE SYNTHASE THYX ET THYA DANS <i>M. TUBERCULOSIS</i> :	59
1.13 LES INHIBITEURS DE THYX.....	68
1.14 PROBLEMATIQUE DE LA THESE	75
1.15 RESUME : TUBERCULOSE, <i>MTB</i> , DIAGNOSTIQUE, TRAITEMENT ET RESISTANCE	77
2. CHAPITRE II : MECANISME DE THYX <i>PBCV-1</i>	78
2.1 INTRODUCTION.....	78
2.2 METHODE : LE STOPPED FLOW	80
2.3 ANALYSE SPECTRALE	82

2.4	RESULTATS	83
2.5	DISCUSSION	88
3.	CHAPITRE III – CINETIQUE DU MECANISME DE THYX <i>MTB</i>	91
3.1	INTRODUCTION.....	91
3.2	RESULTATS	94
3.3	DISCUSSION	120
4.	CHAPITRE IV - MECANISME D'INHIBITION ET MODELE PHARMACOPHORE DE THYX <i>MTB</i>	129
4.1	RAPPEL THEORIQUE : LES DIFFERENTS TYPES D'INHIBITION	130
4.2	RESULTATS :	134
4.3	DISCUSSION	172
5.	CHAPITRE V – CONCLUSION.....	183
6.	BIBLIOGRAPHIE.....	185
7.	ANNEXE 1 : CIBLAGE DE LA THYMIDYLATE SYNTHASE THYX DE <i>HELICOBACTER PYLORI</i> PAR DES HYDROXY-NAPHTHOQUINONES NON-MITOTOXIQUES.....	195
8.	ANNEXE 2 : RESULTAT DU CRIBLE DE NAPHTHOQUINONES POUR L'INHIBITION DE THYX <i>MTB IN VITRO</i>	197
9.	ANNEXE 3 : RESOLUTION DE L'EQUATION (1) EN (3) :.....	215
10.	ANNEXE 4 : RESOLUTION DE L'EQUATION (5) EN (6)	219
11.	ANNEXE 5 : RESOLUTION DES EQUATIONS (10) ET (11) :.....	222

Abréviations :

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ARV :	Anti rétroviraux
ATc :	Anhydrotetracycline
CH ₂ H ₄ folate :	N ⁵ ,N ¹⁰ -méthylène-5,6,7,8-tetrahydrofolate
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
dTMP :	Désoxythymidine monophosphate
dUMP :	Désoxyuridine monophosphate
DHFR :	Dihydrofolate réductase
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
H ₂ folate :	Dihydrofolate
H ₄ folate :	Tetrahydrofolate
INH :	Isoniazide
IC ₅₀ :	Concentration inhibitrice 50%
kDa	Kilo dalton
LTBI :	Latent tuberculosis infection
MDR :	Multi drug resistant
MIC :	Minimal inhibitory concentration
<i>M. smegmatis</i> :	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Mtb</i> :	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NADPH :	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
PAS :	Acide para-aminosalicylique
<i>PBCV-1</i> :	<i>Paramecium bursaria Chlorella virus 1</i>
PCR :	Polymerase chain reaction
RIF :	Rifampicine
SHMT :	Sérine hydroxyméthyl transférase
TB :	Tuberculose
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
XDR	Extensively drug resistant

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste non exhaustives d'organismes pathogène qui possèdent ThyX et/ou ThyA.....	61
Tableau 2 : Des analogues de dUMP ou de CH ₂ H ₄ folate, inhibiteurs de ThyX identifiés dans la littérature	71
Tableau 3 : Vitesse de transfert d'hydrure de et vers la flavine dans ThyX <i>Mtb</i> et ThyX <i>PBCV-1</i>	115
Tableau 4 : Calcul de la constante d'inhibition en fonction du mode d'inhibition d'une molécule.....	133
Tableau 5 : Bilan des résultats obtenus pour l'inhibition de ThyX <i>Mtb</i> et ThyX <i>PBCV-1</i> par C8C1.	145
Tableau 6 : Nouvelle série d'inhibiteurs de type Naphthoquinone de ThyX <i>Mtb</i>	152
Tableau 7 : Constante et mode d'inhibition des inhibiteurs de ThyX <i>Mtb</i> identifiés. Vert : Compétitif. Bleu : Non-compétitif. Rouge : Incompétitif	163

Liste des figures

Figure 1-1 : Schéma des parois de bactéries à gram positif, négatif et des Mycobactéries.	21
Figure 1-2 : Cycle infectueux de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
Figure 1-3 : Cycle de transmission, latence, réactivation et traitement de <i>Mtb</i>	24
Figure 1-4 : Taux d'incidence de cas de tuberculose dans le monde, 2013.	27
Figure 1-5 : Schéma théorique de la diminution de la charge bactérienne en fonction du temps du traitement.	39
Figure 1-6 : Molécules utilisées aujourd'hui dans les traitements contre la tuberculose, et leurs cibles bactériennes.	42
Figure 1-7 : Mécanisme d'action du PAS, sa tolérance et sa résistance.	45
Figure 1-8 : Les différentes stratégies de conception préclinique d'antituberculeux.	53
Figure 1-9 : Schéma des cibles de l'isoniazide (INH) et de l'acide para-amino-salicylique (PAS) dans le métabolisme de synthèse du dTMP et la voie parallèle via ThyX mise en place dans <i>Mtb</i>	57
Figure 1-10 : Les thymidylate synthases ThyX (rouge) et ThyA (orange) de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , leurs substrats et produits.	60
Figure 1-11 : Structure de la Thymidylate synthase ThyA de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	62
Figure 1-12 : Mécanisme enzymatique de ThyA.	63

Figure 1-13 : Structure de la Thymidylate synthase ThyX de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en présence de FAD et de BrdUMP.	65
Figure 1-14 : Schéma simplifié des différentes étapes du mécanisme de ThyX.	66
Figure 1-15 : Empilement du FAD et du BrdUMP dans le site actif de ThyX <i>Mtb</i>	67
Figure 1-16 : Empilement de C8C1 sur le noyau isoalloxanine de la flavine dans le site actif de ThyX <i>PBCV-1</i>	69
Figure 1-17 : Résumé des effets <i>in vivo</i> recensés des dérivés de naphthoquinone.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 1-18 : Analogues de dUMP comme inhibiteurs de ThyX <i>Mtb</i>	72
Figure 1-19 : Structure des dérivés benzoyle (gauche, molécule 14b) et triazole (droite, molécule 16h), identifiés comme inhibiteurs de ThyX.	74
Figure 2-1 : Principe du Stopped-Flow.....	80
Figure 2-2 : Les caractéristiques spectrales exploitables au cours de la réaction catalysée par ThyX.....	82
Figure 2-3 : Réduction et réoxydation successives de <i>PBCV-1</i> ThyX-FAD par le NADPH et par O ₂ respectivement.	85
Figure 3-1 : Orientation de la flavine dans ThyX <i>Mtb</i> (rouge, PDB : 3HZG) et ThyX <i>PBCV-1</i> (bleu, PDB: 2CFA).....	91
Figure 3-2 : Chromatogramme d'exclusion de ThyX <i>Mtb</i>	95

Figure 3-3 : Oxydation du NADPH ou du NADH par ThyX <i>Mtb</i> en présence de dUMP à 37°C, suivie à 340 nm en fonction du temps.....	96
Figure 3-4 : Schéma de stopped flow mis en place. Une concentration constante de ThyX- <i>Mtb</i> est mixée avec différentes concentration de dUMP en jouant sur le ratio dUMP/tampon.....	98
Figure 3-5 : Fixation du dUMP au site actif de ThyX <i>Mtb</i> , mesuré en cinétique rapide.	99
Figure 3-6 : Schéma de stopped flow mis en place. L'enzyme est pré incubée avec du dUMP en excès. Le mélange est injecté dans la cuve de l'appareil de stopped-flow avec une concentration croissante de NADPH en conditions anaérobie.	103
Figure 3-7 : Réduction du FAD dans ThyX <i>Mtb</i> , mesurée par spectroscopie résolue en temps.	104
Figure 3-8 : Schéma de la réaction observée dans la figure 3-7.B lorsque le dUMP se fixe en conséquence de la fixation du NADPH à <i>Mtb</i> ThyX-FAD ..	106
Figure 3-9 : Schéma de Stopped flow mis en place. L'enzyme est pré-réduite par un excès de NADPH en présence de dUMP, puis est mixée avec différentes concentration en CH ₂ H ₄ folate en conditions anaérobies.	110
Figure 3-10 : Ré-oxydation du FADH ₂ dans ThyX <i>Mtb</i> par le CH ₂ H ₄ folate mesurée en spectroscopie résolue en temps.	110

Figure 3-11 : Schéma de stopped flow mis en place et de la réaction étudiée. L'enzyme oxydée et pré-incubée avec du dUMP est mixée à différentes concentration en NADPH en présence d'O ₂	113
Figure 3-12 : Ré-oxydation de ThyX <i>Mtb</i> par le dioxygène.....	114
Figure 3-13 : A. Fraction de ThyX-FAD oxydée, mesurée par l'absorbance à 450 nm en fonction du potentiel appliqué. B. Echelle de potentiel standard pour les couples NADPH/NADP ⁺ , FAD/FADH ₂ dans ThyX <i>PBCV-1</i> et ThyX <i>Mtb</i> , et O ₂ /H ₂ O ₂	116
Figure 3-14 : Vitesse d'oxydation du NADPH par ThyX <i>Mtb</i> en présence de dUMP, et en présence et en absence de CH ₂ H ₄ Folate, en conditions aérobies.	117
Figure 3-15 : Inhibition de l'activité d'oxydation du NADPH de ThyX <i>Mtb</i> par le H ₄ folate.....	118
Figure 3-16 : Schéma général des réactions étudiées dans ThyX <i>Mtb</i> . Les valeurs expérimentales sont en violet. Les flèches en gras représentent le chemin privilégié cinétiquement, en fonction des conditions, issu des observations décrites dans la partie résultat.	121
Figure 3-17 : Orientation du noyau isoalloxazine du FAD dans la structure de ThyX <i>Mtb</i> en présence (bleu, PDB : 2AF6) et en absence (violet, PDB : 3HZG) de dUMP. Image réalisée avec MolSoft.	122
Figure 4-1 : C8C1 est un inhibiteur compétitif du dUMP dans ThyX <i>PBCV-1</i>	130

Figure 4-2 : Schéma globale d'inhibition de l'activité d'une enzyme. K_i est la constante d'inhibition de la molécule. α est le coefficient qui modulent le k_i en fonction de la forme d'enzyme, S : substrat, P : Produit, I : Inhibiteur, E : Enzyme, E-S : complexe enzyme-substrat.....	131
Figure 4-3 : IC_{50} en fonction de la concentration en substrat.	133
Figure 4-4 : C8C1 et autres dérivés de 2-OH-1,4-Naphthoquinone	134
Figure 4-5 : Activité relative d'oxydation du NADPH de 10 μ M de ThyX <i>Mtb</i> en présence de 100 μ M de différentes 2-OH-1,4-Naphthoquinones dans 1% DMSO. La normalisation est faite sur l'activité mesurée en présence de 1% DMSO en absence de naphthoquinones.....	135
Figure 4-6 : Activité relative de synthèse de dTMP de 1 μ M de ThyX <i>Mtb</i> en présence de 100 μ M de différentes 2-OH-1,4-Naphthoquinones dans 1% DMSO.	136
Figure 4-7 : Mode d'inhibition de C8C1 sur ThyX <i>Mtb</i>	137
Figure 4-8 : Courbes de saturation de ThyX <i>PBCv-1</i> et de ThyX <i>Mtb</i> par le dUMP.	139
Figure 4-9 : Mesures de la fraction de FAD ayant du dUMP fixé au site actif de ThyX en fonction de la concentration de C8C1.....	140
Figure 4-10 : Activité d'oxydation du NADPH (mesurée à 340nm) par ThyX <i>Mtb</i> en présence de CH_2H_4 Folate et de différentes concentrations de C8C1 (0 μ M ; 3,125 μ M ; 12,5 μ M ; 25 μ M ; 100 μ M).	141

Figure 4-11 : A) structure de C8C1. B) Spectres d'absorbance de C8C1 sous forme oxydée (pic 480 nm) et réduite (n'absorbe pas dans le visible) obtenues en présence de dithionite en conditions anaérobies.	142
Figure 4-12 : Schéma du stopped flow mis en place. Nous augmentons progressivement la concentration de C8C1 sous forme oxydé sur un mélange constant d'enzyme pré-réduite par le NADPH en présence de dUMP en conditions anaérobies.	143
Figure 4-13 : Ré-oxydation du FADH ₂ par C8C1 dans ThyX <i>Mtb</i> et dans ThyX <i>PBCV-1</i>	144
Figure 4-14 : Recherche par similarité de structure aux naphthoquinones et sélection des molécules à tester contre ThyX <i>Mtb in vitro</i>	149
Figure 4-15 : Résultats du crible des molécules sélectionnées sur l'activité de ThyX <i>Mtb</i>	151
Figure 4-16 : Mesure de l'activité de ThyX <i>Mtb</i> en fonction de sa concentration.	154
Figure 4-17 : Structure de la molécule D5, de formule 2-[(4-methoxyphenyl)methyl]-1,4-dihydronaphthalene-1,4-dione.	155
Figure 4-18 : Détermination du mode d'inhibition de D5.	156
Figure 4-19 : Alignement tridimensionnel des 7 molécules sélectionnées à l'issue du crible, tableau 6. L'alignement a été réalisé avec Marvin Sketch.	158
Figure 4-20 : Mode d'inhibition d'E1, F1, et F2 en fonction du dUMP et du CH ₂ H ₄ folate.	159

Figure 4-21 : Mode d'inhibition de D4, B6 et G7 en fonction du dUMP et du CH ₂ H ₄ folate.....	161
Figure 4-22 : Effet des inhibiteurs de ThyX <i>Mtb</i> sur <i>hThyA</i>	165
Figure 4-23 : Détermination de la MIC ₅₀ des molécules sur <i>Mycobacterium smegmatis</i>	167
Figure 4-24 : C8C1 dans le modèle pharmacophore construit pour ThyX <i>Mtb</i>	169
Figure 4-25 : C8C1 provoque un encombrement stérique très important au site de fixation du dUMP dans ThyX <i>Mtb</i>	173
Figure 4-26 : Structure de D5 et de C8C1.	177
Figure 4-27 : Alignement tridimensionnel de E1, F1 et F2.	178

1. Chapitre I – Introduction

1.1 La tuberculose

La tuberculose, ou peste blanche, est un problème de santé mondial. Elle est causée par une famille de mycobactéries, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) principalement, qui ont infecté un tiers de la population humaine sous une forme dormante [1]. La tuberculose se manifeste par des éternuements (qui durent plus de 3 semaines) accompagnée de crachats parfois contenant du sang, des douleurs de la poitrine, de la fièvre, parfois une grande fatigue, une perte de poids et d'appétit, et des sueurs nocturnes. Bien qu'en recule dans les pays industrialisés, la tuberculose tue toujours 1,5 millions de personnes chaque année [1], et l'émergence inquiétante de souches résistantes aux molécules déjà sur le marché a relancé la recherche de nouveaux traitements.

1.1.1 Un peu d'histoire

La tuberculose est connue depuis l'antiquité pour être une maladie principalement pulmonaire, mortelle, à progression lente. Malgré le développement d'un vaccin dans les années 1920 (partie 1.4, p.15), un adulte sur sept mourrait de tuberculose pendant la première moitié du siècle dernier. Les conditions d'hygiène, la malnutrition avant la révolution verte, ainsi que l'absence de traitements avaient transformé l'épidémie en pandémie [2].

Dans la seconde moitié du XX^{ème} siècle, les antibiotiques, dérivés de molécules d'origine naturelle, tels que la streptomycine isolée à partir d'une souche de *Streptomyces griseus*, sont découverts. Ils permettent de faire reculer la tuberculose, comme beaucoup de maladies infectieuses, de façon remarquable. On pense alors la bataille gagnée, c'est l'ère des antibiotiques [2].

En 1993, alertée par l'augmentation du nombre de cas partout dans le monde, et la dissémination de souches résistantes aux antibiotiques, l'OMS déclare l'urgence sanitaire, et met en garde contre un retour de la tuberculose [1].

L'OMS met donc en place la stratégie DOTS (pour Directly Observed Therapy – Short course) qui vise à aborder les problèmes d'observance des patients en impliquant leurs proches dans l'observation de la prise du traitement, et à lutter contre l'épidémie dans son ensemble en traitant prioritairement les personnes contaminantes (avec une tuberculose pulmonaires active). La mise en place de cet effort coordonné par l'OMS repose sur 5 pilier : i) la volonté politique des gouvernements d'augmenter et pérenniser le financement de la lutte contre la tuberculose, ii) la mise en place de tests diagnostiques bactériologiques sûrs, iii) établir un traitement normalisé des patients et leur soutien, iv) assurer la disponibilité des traitements pour les malades et enfin, v) le suivi de l'épidémie. De cette manière, l'OMS a réussi à améliorer la prise en charge de la tuberculose dans les foyers de l'épidémie et à faire reculer

l'incidence dans plusieurs pays à partir de 2005. Plusieurs antituberculeux sont en développement, et deux nouveaux traitements (Bedaquiline, Janssen Therapeutics, et Delamanid, Otsuka) ont récemment été approuvés pour traiter les cas de tuberculose les plus résistantes. Ces molécules sont efficaces mais présentent également de nombreux risques pour les malades, et ne sont recommandées qu'en dernier recours.

Depuis la naissance de la TB Alliance en 2000, les avancées ont été nombreuses mais insuffisantes. L'urgence sanitaire et le besoin en nouvelles molécules pour le traitement restent toujours d'actualité.

1.2 Le complexe *Mycobacterium tuberculosis*

L'ensemble des mycobactéries qui peuvent causer la tuberculose chez l'Homme sont rassemblées dans ce qui est appelé le Complexe *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Elles présentent des hôtes et des phénotypes différents mais une grande homogénéité génétique, avec 0.01% à 0.03% de polymorphisme nucléotidique [3]. L'agent étiologique de la tuberculose chez l'Homme le plus répandu et le mieux étudié est *Mycobacterium tuberculosis*, dans laquelle on distingue 7 lignages en fonction de leur marqueurs génétiques et leur région d'endémie [4, 5]. Cependant, d'autres mycobactéries peuvent infecter les humains, tel que *M. africanum*, endémique à l'Afrique de l'ouest, ou les mycobactéries zoonotiques, qui peuvent infecter à la fois les humains et certaines espèces animales. Ces dernières portent le nom de l'espèce dans

laquelle elles ont été isolées (*M. Muris*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. orygis*, *M. surricate*, *M. canetti*, *M. microti*) comme *Mycobacterium bovis*, responsable de la tuberculose bovine, connue pour son utilisation dans le développement du vaccin BCG. Ainsi, ces bactéries pourront toutes infecter l'Homme, le risque étant supérieur pour les personnes immunodéprimées [6].

En absence de plasmide naturels et de signes de transferts horizontaux de gènes, il est supposé que l'évolution des bactéries du MTBC proviendrait d'un unique ancêtre commun dénommé *Mycobacterium prototuberculosis* [3]. En découleraient les différents lignages de *M. tuberculosis* d'une part, et l'avènement des espèces zoonotiques d'autre part, concurremment avec la domestication des animaux par l'Homme [7].

Aujourd'hui, la plupart des cas de tuberculose sont causés par *Mtb* (principalement), *M. africanum* (endémique à l'Afrique) et *M. bovis* [8]. Nous nous concentrerons par la suite uniquement sur *Mtb*.

Mycobacterium tuberculosis est une bactérie de l'ordre des *Actinomycetes*, du sous ordre des *Corynebacterineae*. Comme les bactéries du même genre (*Mycobacterium*), elle présente une enveloppe caractéristique constituée, de l'intérieur vers l'extérieur, de peptidoglycane, arabinogalactane, d'acides mycoliques et d'une capsule composée de peptides et de polysaccharides [9]. Cette enveloppe très hydrophobe confère aux

mycobactéries telles que *M. tuberculosis* leur acido-alcolo-résistance, propriété utilisée lors du dépistage par microscopie (voir 1.5).

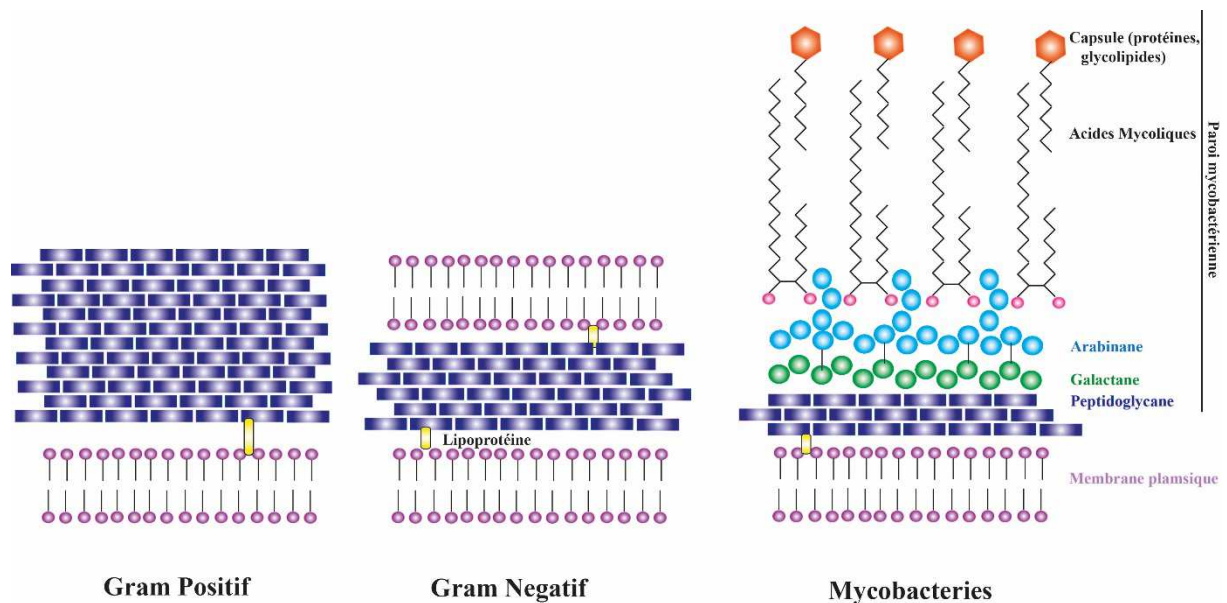


Figure 1-1 : Schéma des parois de bactéries à gram positif, négatif et des Mycobactéries. La paroi des Mycobactéries est plus hydrophobe, riche en acides mycoliques.

Cette enveloppe très hydrophobe de *Mtb* est caractéristique, et contribue à limiter la biodisponibilité des molécules thérapeutiques qui ne peuvent la traverser [10].

Mtb possède un génome de 4.4 Mpb, riche en GC (65%), et dont 8% sont associés au métabolisme des constituants de sa paroi [11]. D'aérobie à anaérobie facultative et pathogène obligatoire, elle peut s'adapter aux environnements très divers auxquels elle sera confrontée durant son cycle infectieux (voir 1.3).

Mtb est souvent désigné comme pathogène « réussi » en raison de sa grande capacité d'adaptation. Elle s'accommode d'abord des multiples

variations dans son environnement (pH, stress oxydant, etc). De plus, sa croissance est lente ($\mu \approx 24h$) et elle a la capacité d'entrer en dormance avec un métabolisme ralenti. Cette dormance ou persistance est particulièrement importante car dans cet état physiologique, les bactéries au métabolisme ralenti deviennent tolérantes aux antibiotiques sans qu'elles ne portent de mutations qui confèrent une résistance. Nous verrons ultérieurement (détaillé dans la partie 1.7) que c'est pour parvenir à éliminer les bactéries en dormance tolérantes aux antituberculeux, que le temps de traitement est aussi long.

Mtb est donc extrêmement résiliente, et nous confronte à la fois à une épidémie silencieuse et dormante et à une hécatombe aux temps de traitements très longs, avec une forte transmission et mortalité. Ces caractéristiques sont un frein majeur dans le combat contre la tuberculose.

1.3 Cycle d'infection de *Mycobacterium tuberculosis*

Les principales étapes du cycle infectieux de *Mtb.* sont résumées dans la figure 1-2.

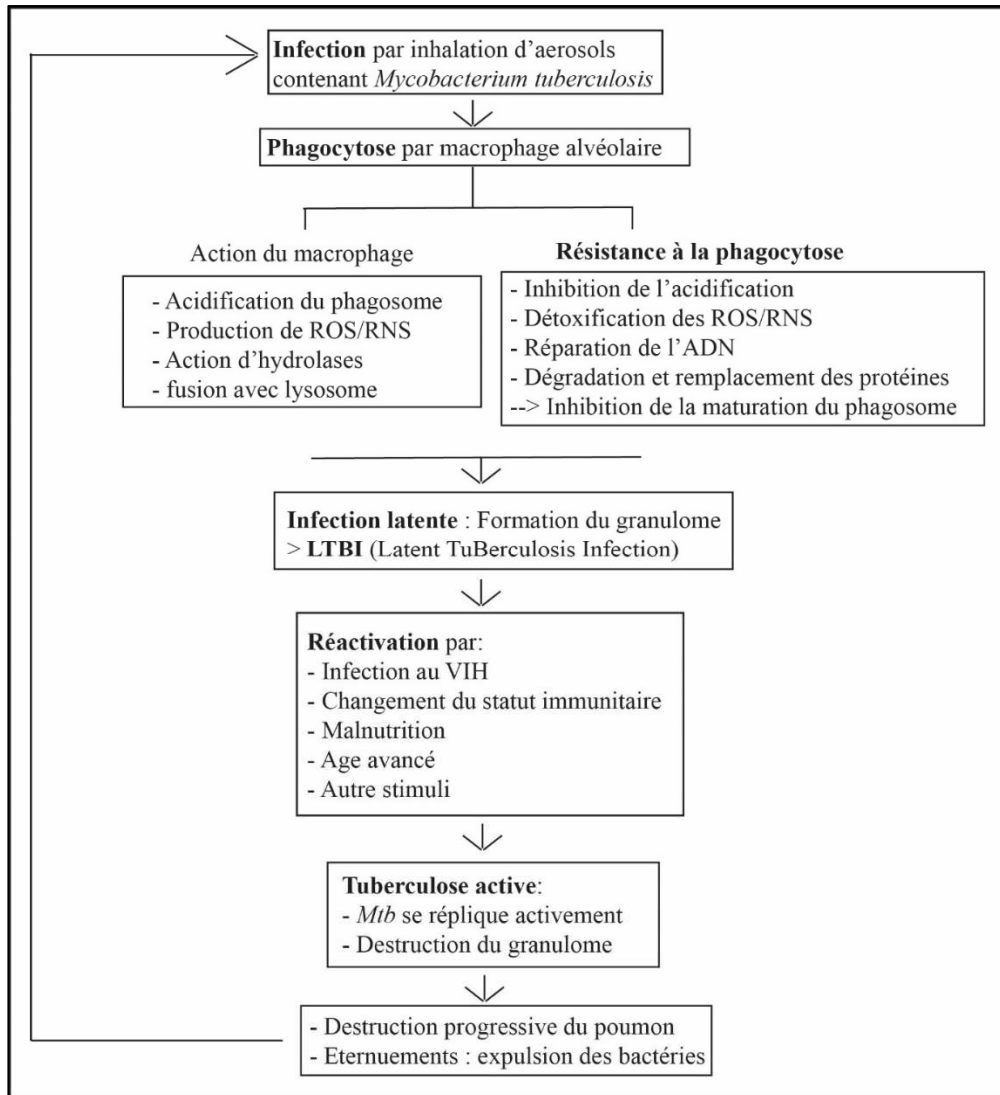


Figure 1-2 : Cycle infectieux de *Mycobacterium tuberculosis*. Les bactéries contenues dans les aérosols (éternuements, etc) sont inhalées dans le poumon et sont phagocytées par les macrophages alvéolaires. Elles sont capables de résister à l'action du macrophage et de persister dans le phagosome. Se met alors en place une infection latente asymptomatique (avec 10% de ré-activation) ou une tuberculose active. La tuberculose active se caractérise par une réplification active de *Mtb* qui induit des lésions pulmonaires, et entre autres, des expectorations chargées en bactéries.

1.3.1 Infection

Mtb infecte l'Homme par voie aérienne à travers des éternuements ou crachats. Elle se retrouve alors dans le poumon où elle est phagocytée par les macrophages alvéolaires. A travers un équilibre complexe entre le système immunitaire de l'hôte et la bactérie, cette infection peut mener à la destruction de la bactérie, sa persistance sous forme latente (95%, Fig.1-3), ou une progression vers une forme active de tuberculose (5%, Fig. 1-3).

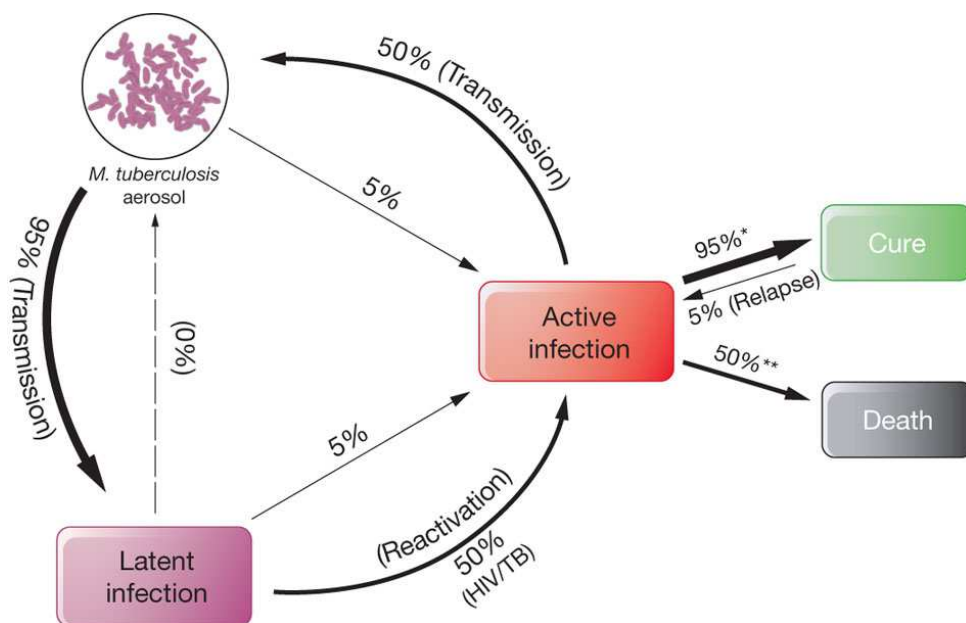


Figure 1-3 : Cycle de transmission, latence, réactivation et traitement de *Mtb*. La transmission de *Mtb* se fait sous forme bacilles contenus dans des aérosols, expulsés par des toux, éternuement ou crachat. 95% des transmissions aboutissent à une infection latente. 5% des infections latentes évoluent vers une tuberculose active durant la vie de l'hôte. Le taux de réactivation est de 50% pour les personnes co-infectées avec le VIH. 95% des personnes traitées pour une souche sensible de tuberculose (*) sont guéries à l'issue du traitement, et 5% d'entre elles font l'objet d'une rechute. L'issue est fatale pour 50% des personnes non traitées (**). D'après Koul et al. Nature. 2011 [12]

1.3.2 Phagocytose

Les macrophages alvéolaires sont des cellules du système immunitaire inné. Ils constituent la première ligne de défense dans le poumon, et leur mode d'action est principalement la phagocytose, c'est-à-dire l'internalisation du microorganisme identifié comme non-soi en vue de sa destruction.

Lors de la phagocytose, *Mtb* se retrouve dans un phagosome à l'intérieur duquel le macrophage met en place plusieurs mécanismes dans le but d'induire la mort de la bactérie : acidification du milieu, production d'espèces réactives d'oxygène et d'azote, enzymes hydrolytiques, etc [13].

1.3.3 Résistance à a phagocytose

La première défense de la bactérie est son enveloppe caractéristique composée de peptidoglycanes, polysaccharides, glycolipides et autres lipides comme les acides mycoliques. Cette paroi très imperméable représente la barrière physique qui protège la bactérie de l'agression du macrophage [10]. De plus, *Mtb* peut persister dans des conditions d'extrême acidité (jusqu'à un pH de 4-5), et est capable d'inhiber l'acidification du phagosome, bloquant ainsi les étapes en aval telles que la fusion au lysosome et l'activité des hydrolases [14-16]. Elle possède également les mécanismes nécessaires à la détoxification des espèces réactives d'oxygène et d'azote produites par le macrophage, notamment par la production de catalases et peroxydases comme KatG [17]. Enfin, *Mtb*

dispose d'une machinerie de dégradation/réparation de l'ADN et des protéines, qui lui permet de résister aux différents stressés cités plus haut [18].

1.3.4 Infection latente (LTBI)

Tant que la bactérie persiste dans le macrophage, la personne infectée ne présente pas de symptômes et n'est pas contaminante [15]. Le macrophage se trouve dans une structure pré-inflammatoire appelée granule, caractéristique d'une infection latente (Latent TuBerculosis Infection ou LTBI) [19]. Une infection latente ne signifie pas une dormance totale des bactéries, mais représente plutôt un équilibre entre la mort et la réplication de *Mtb* dans son hôte. Les estimations indiquent que cette phase peut durer toute une vie (95% des cas) [12] et les causes de la réactivation de l'infection vers une forme agressive et symptomatique sont multiples et n'ont pas toutes été élucidées.

1.3.5 Tuberculose active

Les causes de la réactivation sont mal connues car multiples. Nous y retrouvons : le changement dans le statut du système immunitaire de l'hôte (comme après l'infection par le VIH), la malnutrition, l'âge avancé. Pendant la réactivation, certaines populations de bactéries vont reprendre une forme plus répliquative, induisant la nécrose du granule et ultimement sa destruction au profit d'une charge bactérienne croissante expulsée le plus souvent par une toux. Le cycle d'infection continuera ainsi, d'hôte en hôte.

La latence se caractérise par un équilibre entre l'hôte et la bactérie qui l'infecte. L'évolution de l'infection par *Mtb* dépend donc du système immunitaire de l'hôte, et on observe une synergie entre l'épidémie de tuberculose et du VIH/SIDA qui cible spécifiquement le système immunitaire. En effet, 25% des morts du sida dans le monde sont liés à la tuberculose [1]. Cette polyvalence de *Mtb* entre une infection latente et active en fonction de la configuration, déjà mentionnée plus haut, explique en grande partie le haut pouvoir de virulence de *Mtb*. La synergie observée avec l'épidémie de VIH/SIDA justifie d'autant plus l'urgence sanitaire proclamée par l'OMS.

1.4 L'épidémie actuelle et ses enjeux

1.4.1 Le monde de la tuberculose

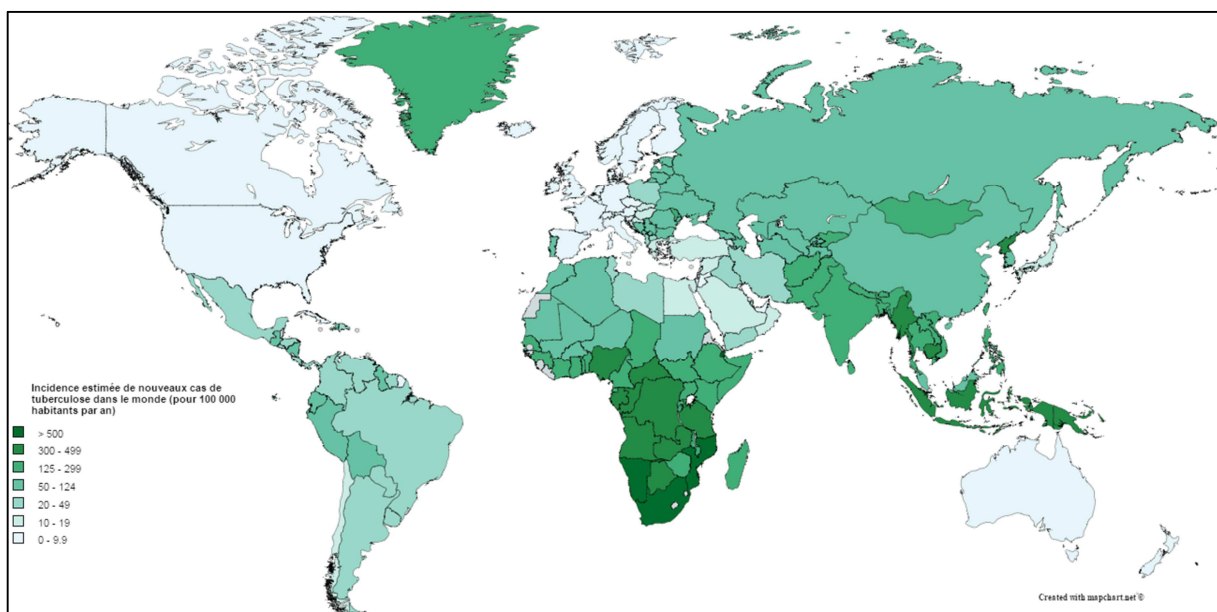


Figure 1-4 : Taux d'incidence de cas de tuberculose dans le monde, 2013. D'après WHO Global TB report 2014 [1].

Dans son rapport sur la tuberculose de 2014, l'OMS estime qu'un tiers de la population mondiale est infectée par une forme latente de tuberculose. Malgré la décroissance progressive du nombre d'infection depuis 2005, nous recensons toujours plus de 9 millions d'infections et 1,5 million de morts par an dans le monde. L'épidémie est particulièrement meurtrière chez les personnes vivant avec le VIH/SIDA. La tuberculose est la deuxième cause de décès due à une maladie infectieuse dans le monde, après le VIH/SIDA.

Les cas de tuberculose dans le monde sont concentrés en Afrique subsaharienne, en Asie et en Amérique du sud (Figure 1-1), le plus souvent dus aux problèmes d'accès au diagnostic et aux soins. L'Afrique compte environ un quart des cas de tuberculose dans le monde et le plus haut taux de prévalence : 280 cas pour 100 000 habitants, plus du double de la prévalence mondiale. L'Asie compte plus de la moitié des cas de tuberculose dans le monde, avec l'Inde et la Chine en première ligne (24% et 11% des cas respectivement) [1]. Au total, 22 pays sont au centre l'épidémie de tuberculose, et on y compte environ 80% des nouveaux cas de tuberculose chaque année (Afghanistan, Bangladesh, Brésil, Cambodge, Chine, République Démocratique du Congo, Ethiopie, Inde, Indonésie, Kenya, Mozambique, Birmanie, Nigeria, Pakistan, Les Philippines, Fédération Russe, Afrique du Sud, Ouganda, République Unie de Tanzanie, Vietnam et Zimbabwe).

En France, l'incidence est estimée à environ 5000 nouveaux cas par an (InVs, Institut national de Veille sanitaire), inférieure à 10 cas pour 100 000 habitants.

1.4.2 L'émergence de la tuberculose résistante

La tuberculose est causée par un ensemble d'espèces bactériennes rassemblées dans le MTBC (*Mycobacterium tuberculosis* complex), avec *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) comme agent étiologique principal. Le traitement d'une souche sensible aux antibiotiques de *Mtb* se compose d'une

combinaison d'au moins 4 antibiotiques (isoniazide, rifampicine, ethambutol et pyrazinamide) avec un taux de réussite de 86% [1]. Il s'agit du traitement dit de première ligne, mis en place systématiquement lorsque la tuberculose est détectée. Il est long (au moins 6 mois), avec des effets indésirables lourds, et l'observance des patients n'est pas toujours optimale.

Nous assistons à l'émergence de souches de *Mtb* résistantes aux molécules les plus importantes du traitement de première ligne (isoniazide et rifampicine), appelées souches multirésistantes (MDR), et le nombre de personnes en échec thérapeutique ou en récurrence augmente [20]. Les souches MDR de *Mtb* (480 000 cas en 2013) représentent 3,5% des cas de tuberculose tandis qu'ils constituent 20% des récurrences. Cette surreprésentation des souches résistantes chez les personnes déjà traitées révèle que l'utilisation abusive des molécules combinée à la mauvaise observance des traitements participe grandement à l'émergence de ces souches [1].

L'OMS montre que le nombre de patients sous traitement pour une tuberculose multi résistante a doublé entre 2010 et 2013. Plusieurs tests de susceptibilité aux antituberculeux (DST pour Drug Susceptibility Test), permettent de déterminer si une souche clinique est résistante ou sensible aux molécules disponibles. Cependant, les DST ne sont pas systématiques dans les régions les plus à risque : en 2013, moins de 10% des cas de tuberculose confirmés bactériologiquement ont été soumis à un DST [1]. C'est pourquoi

l'OMS suppose que ses chiffres sont encore des sous-estimations. L'émergence de souches multi-résistantes suscite beaucoup d'inquiétudes car le traitement pour ce type de tuberculose est plus long (20 mois au minimum), 100 fois plus couteux et le taux de réussite est de 40 à 70% seulement. Ce taux de réussite est de 22% pour une tuberculose ultrarésistante, c'est-à-dire résistante aux molécules les plus importantes de première et seconde ligne (isoniazide, rifampicine, fluoroquinolone et au moins un aminoglycoside : kanamycine, amikacine, capreomycine). Les souches ultrarésistantes représentent environ 10% des cas de multirésistance [1].

De nouveaux traitements, plus efficaces, plus rapides et moins toxiques sont donc nécessaires afin de combattre l'épidémie.

1.5 Le dépistage

Parmi la grande variété de tests de dépistage de la tuberculose, nous distinguons les tests qui détectent la bactérie pathogène, de ceux qui mesurent la réponse immunitaire. La radiographie aux rayons X peut révéler les lésions dans le poumon provoquées par une tuberculose active.

1.5.1 Détecter la bactérie

Pour détecter la bactérie pathogène, le test le moins couteux consiste à les observer après coloration dans les échantillons d'expectoration par microscopie. Il existe également une grande variété de tests diagnostiques basés sur la mise en culture des bactéries ou l'amplification et détection de l'ADN bactérien [21].

L'observation des mycobactéries contenues dans les expectorations par microscopie est la méthode la moins coûteuse, la plus répandue, et l'une des plus rapides [22]. Elle repose sur la coloration de Ziehl-Neelsen, spécifique aux mycobactéries. En effet, les mycobactéries présentent une enveloppe caractéristique, très hydrophobe, avec des acides gras, dont des acides mycoliques, à leur surface. Cette paroi spécifique leur confère une acido-alcool-résistance. Après coloration de l'ensemble de l'échantillon par la fuchsine, un traitement d'acide et d'alcool est appliqué afin de le décolorer : seules les mycobactéries résisteront à cette décoloration et seront visibles sous un microscope optique. La fuchsine est aujourd'hui remplacée par l'auramine-rhodamine, marqueur fluorescent dont l'utilisation permet d'améliorer la robustesse du test [23, 24].

Dans un deuxième temps, la mise en culture d'échantillons d'expectoration permet de confirmer la présence de *Mtb*. Cette technique est lente (plusieurs jours à plus d'un mois), coûteuse, et nécessite une infrastructure et un laboratoire équipé mais reste la technique de référence pour confirmer une tuberculose. Elle est régulièrement réalisée dans le milieu Löwenstein-Jensen ou dans les systèmes de culture automatisés comme MB BACTEC (Becton Dickinson) [21, 25].

Une grande diversité de milieux ont été développés et optimisés afin d'une part, de diminuer le temps de la culture et d'autre part, de permettre une

lecture plus facile et plus sûre des résultats. Les méthodes de détection sont diverses : mesure d'un indicateur coloré ou fluorescent de croissance, détection de gaz consommés ou produit par les mycobactéries, mesure de la quantité de nitrite dans le milieu, indiquant la croissance. Cependant, en raison du coût des instruments, de leur entretien ou du niveau de formation requis pour les utiliser, beaucoup ne sont pas implantables dans des régions à ressources limitées, qui sont pourtant les plus touchées.

C'est pourquoi l'OMS promeut aujourd'hui les tests moléculaires qui reposent sur la détection de l'ADN bactérien par PCR. GeneXpert MTB/RIF est le test de dépistage recommandé par l'OMS, accessible à prix préférentiel dans les pays où se concentre l'épidémie. Ce test est capable de détecter la présence de *Mtb* directement dans les échantillons d'expectoration et d'identifier si la souche est résistante à la rifampicine (molécule utilisée en première ligne de traitement) en un seul test avec une sensibilité de 89% et une manipulation minimale [26]. La rifampicine cible l'ARN polymérase de *Mtb*, dont la sous unité β est codée par le gène *rpoB*. 95% des résistants à la rifampicine présentent une mutation dans une région de 80 nucléotides du gène *rpoB*. De plus, la séquence de cette région est spécifique aux mycobactéries, et cette spécificité est utilisée pour les identifier : Le GeneXpert MTB/RIF repose sur l'amplification de cette région du gène *rpoB* dans un échantillon d'expectations et son hybridation à différents oligonucléotides couplées à des fluorophores qui

permettent i) de confirmer la présence de mycobactéries et ii) de prédire la résistance à la rifampicine. 90% des résistants à la rifampicine sont également résistants à l'isoniazide [27]. La résistance à la rifampicine est donc utilisée comme un indicateur de souches multi-résistantes (c'est à dire résistantes à la rifampicine et à l'isoniazide). Le GeneXpert MTB/RIF présente l'avantage de ne demander qu'une préparation minimale de l'échantillon afin de diminuer les risques de contaminations pour le personnel qui le manipule, et a été automatisé afin d'être implanté dans des régions à forte charge tuberculeuse et à ressources limitées. Cependant, il ne détecte qu'une seule résistance. Son coût a été négocié avec Cepheid, le fournisseur, par l'OMS et FIND (Foundation for INnovatide Diagnostics). Le GeneXpert se compose d'un appareil (environ 17000 \$) pouvant traiter 4 cartouches (10 \$/cartouche) en moins de deux heures. Le GeneXpert MTB/RIF présente beaucoup d'avantages mais ne détecte qu'une seule résistance. Vu l'investissement dans ce test, nous pouvons également nous poser la question du financement de futurs tests diagnostiques plus exhaustifs, tant dans leur développement que leur implantation [28].

1.5.2 Détecter les résistances

Le défi aujourd'hui consiste à détecter les souches résistantes précocement, mais nous verrons plus loin que la nature de ces résistances n'est pas toujours bien définie, et limite le développement d'outils rapides et fiables. Les résistances sont causées par des mutations dans le génome de *Mtb* qui

annulent l'action d'une molécule (1.9 Résistance aux traitements). Détecter la résistance peut se faire de manière phénotypique par culture des bactéries en présence d'une concentration seuil d'antituberculeux, ou de manière génotypique, par amplification spécifique d'ADN, et identification d'une mutation associée à une résistance.

La culture est encore une fois la méthode de référence qui permet de confirmer une résistance, et la croissance peut être réalisée et mesurée de différentes manières comme cité précédemment. Une méthode alternative consiste à observer les bacilles en culture avec des antibiotiques au microscope. Cette méthode appelée MODS (pour Microscopic Observation Drug Susceptibility) permet d'accélérer la détection de résistances, est peu coûteuse, et est très fiable pour l'isoniazide et la rifampicine, les deux molécules les plus importantes qui composent la première ligne de traitement.

Le test HAIN est l'un des plus exhaustifs. Il consiste à amplifier l'ADN bactérien par PCR, puis à l'hybrider sur des bandes contenant des sondes spécifiques de la plupart des mutations associées à une résistance. Ainsi, il peut de déceler plusieurs résistances en même temps mais il est chronophage et nécessite des manipulations par un personnel formé.

1.5.3 Détecter la réponse immunitaire

Afin de détecter une tuberculose latente, deux tests sont très répandus : le test d'intradermoréaction (IDR) et l'IGRA (Interferon Gamma Release Assay)

[29]. Tous deux détectent indirectement l'infection en mesurant la réponse du système immunitaire [19].

L'IDR ou test Mendel-Mantoux consiste à injecter de la tuberculine sous la peau. La tuberculine est un extrait stérile et filtré de cultures de mycobactéries tuberculeuses dans de la glycine. Les protéines contenues représentent un mélange divers d'antigènes mycobactériens. La réaction immunitaire à la tuberculine provoque une inflammation rouge à l'endroit de l'injection. Le diamètre de la réaction inflammatoire est mesuré 48 à 72 heures après l'injection. C'est le test le plus utilisé pour détecter une infection latente. Cependant, des faux positifs peuvent être retrouvés chez les personnes vaccinées au BCG, vaccin très courant dans les régions les plus à risque. De plus, de faux négatifs sont fréquents chez les personnes immunodéprimées comme les personnes vivant avec le VIH/SIDA, population particulièrement à risque [1]. Enfin, il nécessite deux passages du patient au centre de soin, ce qui implique des pertes de suivi [29].

Le principe de l'IGRA repose également sur la réponse immunitaire. L'interféron gamma est une cytokine spécifique secrétée par les lymphocytes en réponse à une stimulation du système immunitaire. Le test IGRA consiste à mesurer la production d'interféron gamma par un échantillon de sang après exposition à des antigènes spécifiques du MTBC comparé à l'exposition à un contrôle [30].

En pratique, diagnostiquer une tuberculose nécessite une combinaison de tests (radiographie, microscopie, culture, IDR ou IGRAs, et tests moléculaires si disponibles) car les symptômes cliniques (toux et autres) ne sont jamais définitifs. Dans le cas de la tuberculose, il existe un fossé entre les pays à forte charge tuberculeuse et faible revenu, et les pays à tendance inverse. Par conséquent, et malgré la diversité de tests diagnostiques mis au point, leur coût est le frein majeur à leur implémentation dans les zones où ils sont le plus nécessaires [28].

1.6 Le traitement préventif

Un vaccin contre la tuberculose a été développé dans les années 1920 à l'institut Pasteur de Lille puis de Paris par Albert Calmette et Camille Guérin. Ces derniers cultivaient *M. bovis*, responsable de la tuberculose bovine qui peut également infecter l'Homme. Ils notent que les bacilles cultivés sur des tranches de pomme de terre trempés dans de la bile de bœuf stérile perdent de leur virulence après des cultures successives. Ces bactéries étaient ensuite administrées afin de stimuler l'immunité de la personne, et la protéger contre une infection par *M. tuberculosis*. Il s'agit alors du premier vaccin contre la tuberculose : le BCG pour Bacille Calmette-Guérin.

La protection conférée par le BCG est estimée à 75-85% chez l'enfant, et de 50-75% chez l'adulte. En France, le vaccin a été obligatoire de 1950 à 2007.

L'obligation a été levée en raison de la faible efficacité du BCG (hormis chez les enfants pour des formes de tuberculose précoce) et de la faible incidence de la tuberculose en France. Il est toujours recommandé de se faire vacciner pour les personnes susceptibles d'être exposées à la bactérie. Cette population à risque est délimitée en fonction de leur lieu de naissance, de résidence ou de leur profession.

1.7 Les traitements

Une tuberculose se compose de populations de bactéries dont l'état physiologique sera divers. Ainsi, la longueur du traitement est associée à la diversité de populations de *Mtb* qui coexistent dans une même infection. *Mtb* peut se trouver dans un état répliatif et métaboliquement très actif ou dans un état de dormance caractérisé par un métabolisme différent, moins actif et une résistance phénotypique à certains traitements (même si elle y est sensible génétiquement) [10].

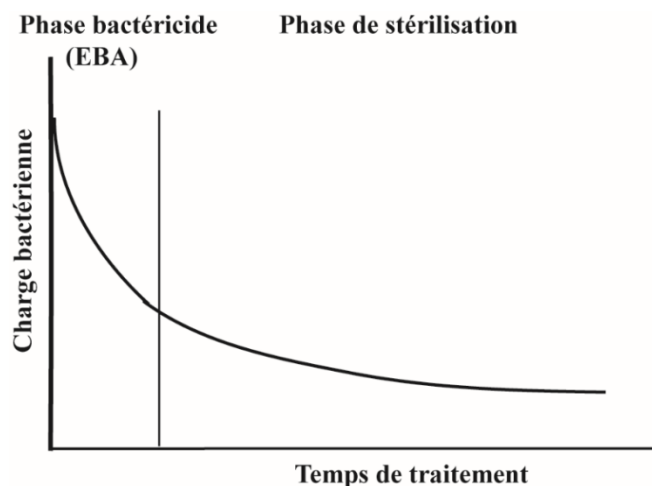


Figure 1-5 : Schéma théorique de la diminution de la charge bactérienne en fonction du temps du traitement. La courbe est biphasique. La première phase représente l'EBA (Early bactericidal Phase) ou phase bactéricide, au cours de laquelle les populations de bactéries à réplication active sont majoritairement ciblées par les molécules. La seconde phase ou phase de stérilisation qui cible des populations de bactéries dormantes, phénotypiquement plus résistantes aux traitements.

Dans le cadre d'une infection, on retrouve ces deux extrêmes avec un continuum entre les deux [31]. Au cours du traitement, il a été montré que la charge bactérienne décroît de manière biphasique. Une première phase, rapide, appelée EBA (Early bactericidal phase, Fig. 1-5), correspond à l'effet bactéricide sur les bactéries surtout sous forme répliative, ciblées principalement par l'isoniazide (mais pas uniquement). La seconde phase, dite de stérilisation (Fig. 1-5), est limitée par l'activité plus faible des molécules sur les bactéries dormantes, ciblées principalement par la rifampicine [32]. Cette phase est donc plus longue (au moins 4 mois) et prolonge la longueur du traitement. Nous verrons dans la partie 1.10 que la diminution du temps de traitement est un objectif majeur dans la recherche d'antituberculeux

aujourd'hui, et cela passe par le ciblage de populations dormantes de bactéries [33].

1.7.1 Les traitements de première ligne

Le traitement d'une tuberculose sensible est réalisé en deux phases successives : 2 mois de rifampicine, isoniazide, pyrazimidine, et ethambutole suivis de 4 mois de rifampicine et isoniazide pour un taux de réussite d'environ 86% [1].

1.7.2 Les traitements de seconde ligne

En cas d'échec ou d'identification de résistances, des traitements de seconde ligne existent, tels que les fluoroquinolones, l'acide para-aminosalicylique, ou les aminoglycosides, communément appelés traitements par injection de seconde ligne (Kanamycine, Capreomycine, Amikacine), pour une durée minimale de 20 mois et un taux de réussite de 40 à 70% avec des effets indésirables plus lourds [1].

Même dans le cas où le traitement est un succès, on ne peut exclure la persistance de *Mtb* sous forme dormante qui aura résisté au traitement (résistance phénotypique) ou sera devenue résistante (résistance génétique). Le traitement est donc difficile et les récurrences fréquentes.

1.7.3 Les souches résistantes

Une souche multi-résistante (MultiDrug Resistant ou MDR) de *Mtb* est une souche résistante à la fois à l'isoniazide et à la rifampicine, les deux molécules de premières lignes les plus importantes [34]. Une souche ultra-résistante (eXtensively Drug Resistant ou XDR) est une souche multi-résistante qui résiste également à une fluoroquinolone et au moins une molécule injectable de seconde ligne (capreomycine, amikacine, kanamycine).

Les cas de tuberculose multirésistante représentent 3.5% des cas déclarés mais une récurrence sur cinq (20%) est due à une souche multirésistante de *Mtb*. La longueur des traitements, et les effets indésirables induisent une mauvaise observance des patients, ce qui participe grandement à l'émergence de ces souches.

Les souches XDR de *Mtb* ont été confirmées dans une centaine de pays et représentent 9% des souches MDR [1]. Il est urgent de développer de nouveaux traitements à la fois mieux tolérés et plus efficaces afin de combattre efficacement ce type de bactéries.

1.8 Mécanisme d'action des antituberculeux actuels

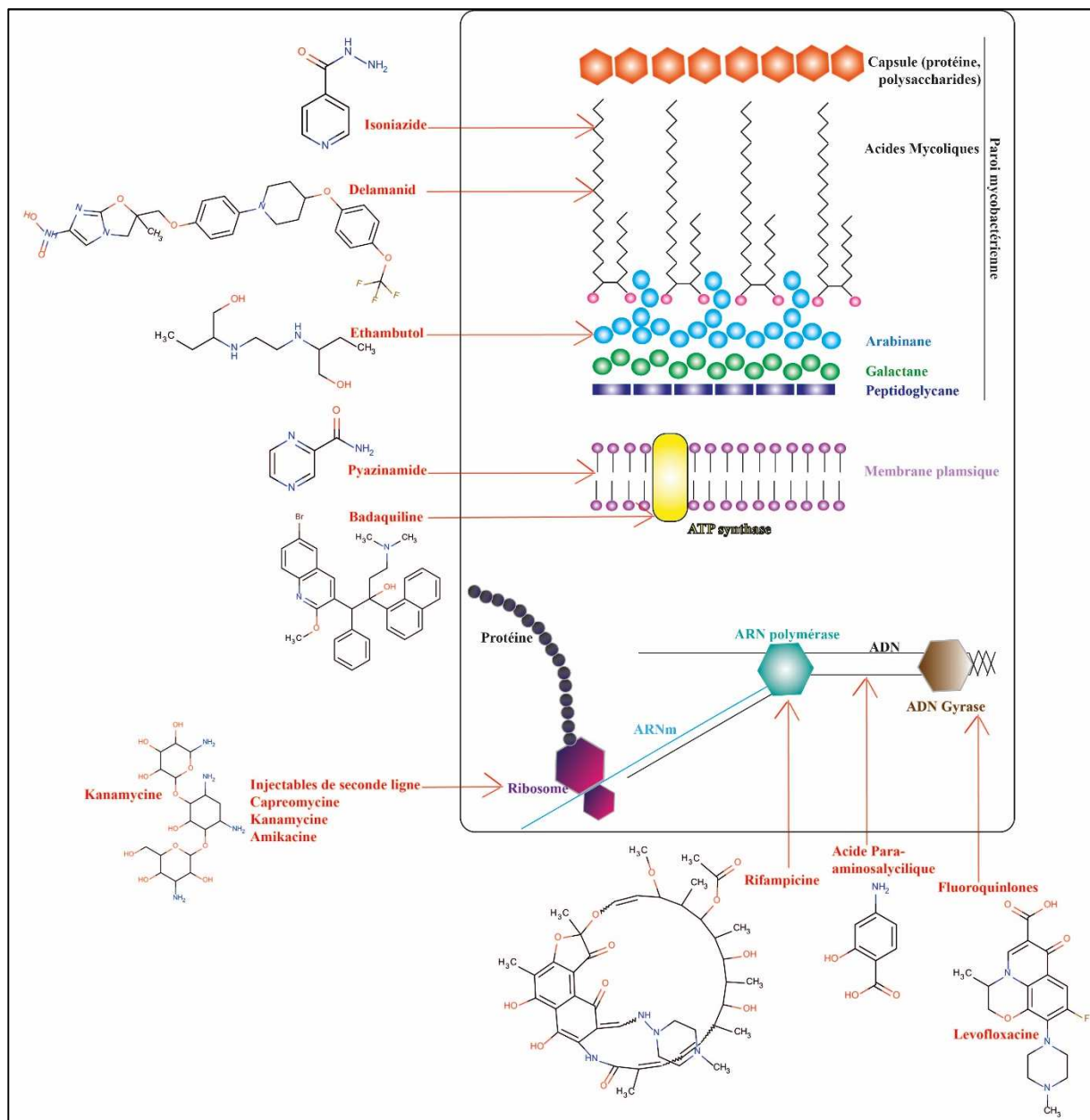


Figure 1-6 : Molécules utilisées aujourd'hui dans les traitements contre la tuberculose, et leurs cibles bactériennes. L'isoniazide et le delamanid ciblent la synthèse d'acides mycoliques. L'ethambutol cible la synthèse d'arabinogalactane. Le pyrazinamide interfère avec le pH cellulaire et la synthèse d'ATP. La bedaquiline cible l'ATP synthase. Les molécules injectables de seconde ligne ciblent le ribosome et la synthèse protéique. La rifampicine cible l'ARN polymérase et la transcription. L'acide para-aminosalicylique cible la synthèse de thymidylate et le métabolisme des folates. Les fluoroquinolones inhibent l'ADN gyrase.

1.8.1 Les traitements de première ligne

La rifampicine cible RpoB (Fig. 1-6), la sous unité β de l'ARN polymérase dans *Mtb*, inhibant ainsi la transcription dans la bactérie [35].

L'isoniazide (INH, Fig. 1-6) est une prodrogue. Elle doit être activée par la catalase/péroxydase KatG. KatG accepte comme réducteur à la fois le NADPH et le NADH, et forme en présence d'INH un complexe covalent INH-NAD(P). INH-NAD inhibe InhA, une protéine impliquée dans l'élongation des acides gras dans la voie de biosynthèse des acides mycoliques, cible majoritaire de l'isoniazide [36, 37]. INH-NADP inhibe la DHFR, responsable du maintien du stock cellulaire de folates réduit. Son activité est essentielle à la synthèse de déoxythymidine monophosphate (dTMP), un précurseur de réparation et réplification de l'ADN, par la thymidylate synthase ThyA [37].

Etant donné que l'isoniazide cible majoritairement la synthèse de précurseurs de la paroi, elle a une activité contre *Mtb* sous forme répllicative mais est faiblement active contre les bactéries au phénotype dormant qui ne mobilisent que faiblement ce métabolisme [35].

Le pyrazinamide (Fig. 1-6) est également une prodrogue, activée par la nicotinamidase PncA, qui forme l'acide pyrazinoïque, actif essentiellement en milieu acide. Ses effets dans la bactérie sont multiples. Sa forme acide libère des protons dans le cytoplasme, ce qui interfère avec le potentiel membranaire, le

pH intracellulaire et la synthèse d'ATP [35, 38]. Il cible également la trans-traduction en inhibant RpsA, une protéine essentielle de la sous-unité 30s du ribosome [39]. Son activité est également associée à l'inhibition de PanD, une enzyme impliqué dans la synthèse de coenzyme A [40]. Paralyser les mécanismes de production d'énergie dans *Mtb* permet aussi au pyrazinamide de cibler particulièrement les populations de bactéries dormantes. Son utilisation a permis de réduire la durée du traitement initialement de 9-12 mois à 6 mois.

L'ethambutole cible EmbB (Fig. 1-6), une arabinosyl transférase impliquée dans la synthèse de la paroi bactérienne [41]. Cette molécule a un effet bactériostatique sur la population répliquative de *Mtb*, mais ne présente pas d'effet sur les bactéries au phénotype dormant [35].

1.8.2 Les traitements de seconde ligne

Les traitements de seconde ligne sont recommandés pour les souches MDR qui présentent une résistance aux deux plus importantes molécules de première ligne : l'isoniazide et la rifampicine.

Les fluoroquinolones ciblent l'ADN gyrase dans *Mtb* (Fig. 1-6). L'ADN gyrase est responsable du maintien du surenroulement du chromosome bactérien par une réaction ATP dépendante qui implique la coupure et la ligation du brin d'ADN. Les fluoroquinolones inhibent l'étape de ligation. Leur effet induit

l'accumulation des coupures simple et double brin de l'ADN et la mort cellulaire [38].

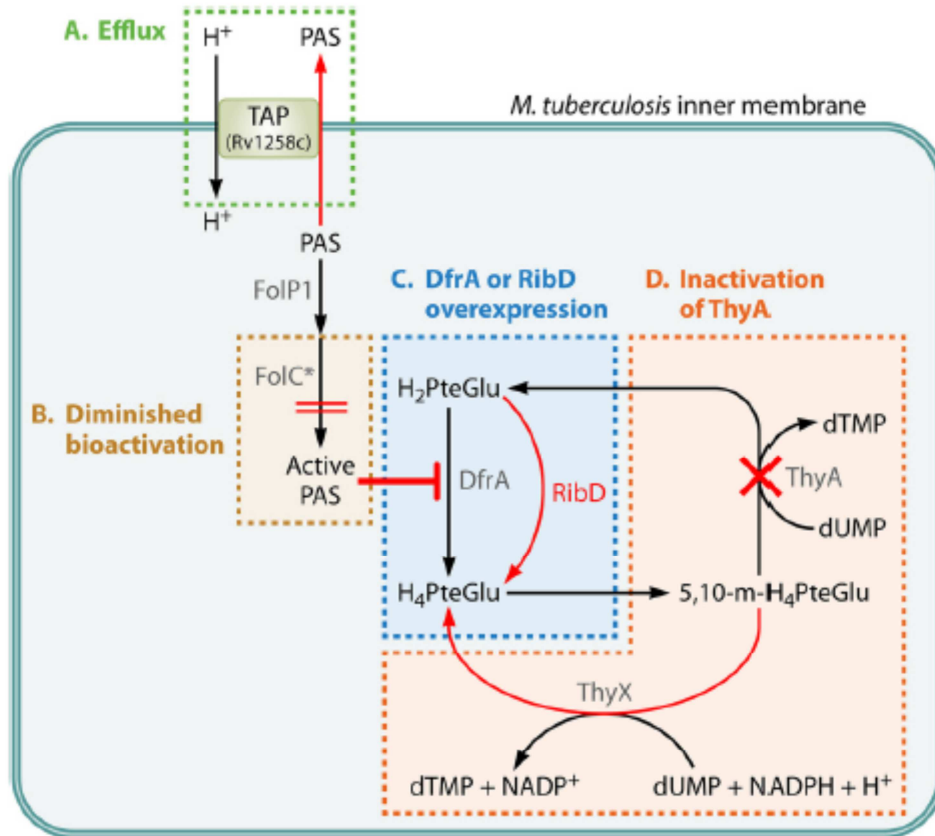


Figure 1-7 : Mécanisme d'action du PAS, sa tolérance et sa résistance. A) efflux actif hors de la bactérie. B) Bioactivation par FolC diminuée par certaines mutations. C) Surexpression de RibD et DHFR (DfrA). D) Inactivation de ThyA induit la résistance en PAS. L'absence de ThyA est compensée par la présence de la seconde thymidylate synthase ThyX. D'après Minato et al. 2015 [42].

L'acide para-aminosalicylique (PAS) est une prodrogue activée par le métabolisme des folates (DHPS et DHFS, codées par *folP1* et *folC* respectivement, figure 1-7, deux enzymes impliquées dans la voie de synthèse des folates). Les folates sont des métabolites qui transportent des radicaux mono-carbonés et sont essentiels à beaucoup de fonctions telles que la synthèse de nucléotides et d'acides aminés. La DHFR réduit le dihydrofolate (H_2 folate ou

H₂PteGlu dans la figure 1-7), produit de la synthèse de dTMP par la thymidylate synthase ThyA. La forme active de PAS inhibe la DHFR de *Mtb*. [43]. Ainsi, une perte de fonction de ThyA a ainsi été associée à la résistance au PAS [44]. *Mycobacterium tuberculosis* possède deux thymidylate synthase différentes, et la seconde, ThyX, thymidylate synthase flavine-dépendante (qui est l'objet principal de cette thèse), est essentielle et suffisante pour une croissance in vivo [44]. ThyX produit du H₄Folate au lieu du H₂Folate. L'activité ThyX ne nécessite donc pas d'activité DHFR, court-circuitant ainsi le mode d'action du PAS (Figure 1-7). La voie impliquant ThyX est une voie de sauvetage dans le mécanisme de résistance au PAS [42]. Nous aurons l'occasion d'aborder plus précisément la place de ThyX dans *Mtb*, et son rôle dans l'apparition de résistance au PAS dans la partie 1.11.

Les molécules injectables de seconde ligne (Kanamycine, Amikacine, Capreomycine, Fig. 1-6) sont des aminoglycosides et inhibent la traduction dans *Mtb*. Ils se fixent sur l'ARN ribosomal 16S, inactivant ainsi le ribosome [45].

1.8.3 Quels traitements pour une tuberculose ultrarésistante ?

Pour une souche ultrarésistante (XDR) de *Mtb*, les options thérapeutiques sont maigres [46] : dans une cohorte de 2011 pour des patients sous traitement pour une tuberculose de ce type, le traitement fut efficace pour 22% d'entre eux, 35% sont morts, 10% étaient en échec thérapeutique, et le suivi fut perdu pour

les 33% restants [1]. Ces chiffres alarmants montrent pourquoi la dissémination de ces souches inquiète les organismes sanitaires mondiaux.

En 2012, la FDA (agence du médicament américaine) a accéléré la mise sur le marché de deux nouveaux antituberculeux : i) La Bedaquiline, une diarylquinoline qui cible l'ATP synthase de *Mtb* [47, 48] ; ii) Le Delamanid, une nitroimidazole qui cible la synthèse d'acides mycoliques [49]. Ces deux molécules présentent un effet bactéricide sur les bactéries en répliation et dormante.

La bedaquiline représentait un grand espoir car elle présente un mode d'action nouveau en ciblant spécifiquement l'ATP synthase, et une efficacité accrue *in vitro* et dans les modèles murins. Cependant, elle induit la prolongation de l'intervalle QTc du patient (mesure de la durée entre la dépolarisation et la repolarisation pendant un électrocardiogramme) et les organismes de santé recommandent aujourd'hui son utilisation uniquement pour des cas de tuberculose pour lesquels les autres options sont épuisées [50].

Le mode d'action du Delamanid n'est que partiellement résolu. Il s'agit probablement d'une prodrogue, activée par le système F420 mycobactérien (composé de flavoprotéines particulières impliquées dans la détoxification des ROS) [51]. Le delamanid activé inhibe la voie de synthèse des acides mycoliques, composants essentiels de l'enveloppe mycobactérienne [52]. Cependant, des effets similaires à ceux observés avec la bedaquiline sur le

système cardiovasculaire des patients, ont été obtenus avec le delamanid. Des études sont en cours afin de les mesurer.

Par ailleurs, le groupe d'expert de l'OMS ne recommande pas de combiner la bedaquiline et le delamanid car il craint l'effet additif dangereux des effets indésirables de ces deux molécules. De plus, les études cliniques ont révélé que ces deux molécules ne réduisent pas dramatiquement le temps du traitement, les experts ne s'attendent donc pas à un impact majeur sur l'épidémie avec ces nouveaux traitements [53].

Néanmoins, pour certains malades, l'absence d'alternative thérapeutique et le rapport bénéfice/risque vont dans le sens de l'utilisation de ces molécules, malgré les effets indésirables suscités.

1.9 Résistance aux traitements

Par quels mécanismes les bactéries échappent à l'action des antibiotiques que nous développons et sommes susceptibles de développer ? *Mtb* se distingue par sa capacité d'adaptation et dispose de mécanismes de tolérance et de résistance aux antibiotiques (Molecular genetics of Mycobacteria, 2nd edition, Graham et al. 2014).

- Les mécanismes de tolérance n'impliquent pas de modification du génome de la bactérie (pas de mutation). Ils sont transitoires et non transmissibles :

- **Diminution de la biodisponibilité** par diminution de la perméabilité de la paroi ou accroissement de l'expression et de l'activité des pompes à efflux. Dans *Mtb*, la surexpression des pompes à efflux a été identifiée comme la première étape dans le développement de résistance. Ce mécanisme adaptatif apparaît 7 jours seulement après l'exposition à des concentrations sous-létales d'antibiotiques [54]. Cette étude illustre bien comment une mauvaise observance peut mener à l'apparition de résistances.

- **La dormance**, ou persistance, est un état physiologique qu'adoptent des populations de *Mtb* dans le poumon. Cet état se caractérise par un métabolisme ralenti que ne peuvent cibler les antibiotiques qui inhibent uniquement des mécanismes impliqués la réplication de la bactérie. L'éthambutol, par exemple, cible la synthèse de précurseurs de la paroi mycobactérienne. Ce métabolisme est moins actif dans les bactéries dormantes. C'est pourquoi l'éthambutol n'a pas d'effet sur ces populations de bactéries.

- Les mécanismes de résistances, contrairement aux mécanismes de tolérance, sont liés à des mutations spécifiques, et sont donc transmissibles :

- **Production d'enzymes de dégradation/titration des molécules** : *Mtb* produit des β -lactamases qui dégradent les antibiotiques de type β -lactamine (ampiciline, amoxiciline, etc) [55].

- **Mutation des enzymes impliquées dans l'activation/métabolisme des molécules** : par exemple, la résistance à l'isoniazide est associée, entre autres, à des mutations dans *katG*, qui code pour la catalase qui active la prodrogue.

- **Mutation de la cible** : la résistance aux fluoroquinolones chez *Mtb* est provoquée par une mutation dans les gènes *gyrA* ou *gyrB*. En effet, le site de fixation des fluoroquinolones est à l'interface entre GyrA/GyrB dans le complexe A₂B₂ qui forme l'enzyme active, et la mutation de ce site empêche l'inhibition de l'activité gyrase par les fluoroquinolones.

Les cibles moléculaires des traitements assurent toujours des fonctions essentielles. Par conséquent, les mutations conférant une résistance peuvent également induire des effets néfastes sur la « fitness » de la bactérie. La « fitness » de la bactérie représente à la fois sa viabilité, mais aussi sa capacité à coloniser son environnement, en compétition avec d'autres souches ou d'autres espèces. Ainsi, une souche « fraîchement » résistante dont la compétitivité ou l'infectiosité est diminuée par rapport à son homologue sensible se disséminera plus difficilement. D'ailleurs, les études épidémiologiques ne rencontrent que très rarement ce type de souches [56].

Par opposition, nous pouvons observer l'apparition de mutations dites compensatoires. Une mutation compensatoire est, comme son nom l'indique, une mutation qui compense pour l'effet négatif sur la fitness de la bactérie résistante par rapport à son homologue sensible [56]. Dans les souches cliniques,

on voit que ce type de mutations est sélectionné d'une part par la pression exercée par les antibiotiques, d'autre part par la compétition avec les souches homologues sensibles, et enfin par les conditions de croissance de la souche [57]. Par exemple, la résistance à la rifampicine est causée par une mutation de la sous unité β de l'ARN polymérase. Or cette mutation induit un défaut de croissance de la souche résistante. Mais des études de séquençages des souches cliniques de *Mtb* résistante à la rifampicine ont révélées un enrichissement en mutations qui compensaient ce défaut de croissance, particulièrement dans le gène codant pour la sous unité β' de l'ARN polymérase [58]. En résulte une souche résistante à la rifampicine, dont la viabilité et l'infectiosité est la même que celle de son homologue sensible.

Dans ce contexte, la perspective de l'émergence de souches multi- ou ultrarésistantes avec une fitness améliorée est particulièrement inquiétante, et fait planer la possibilité d'un retour à l'ère pré-antibiotique.

Plus généralement, et mis à part *rpoB*, associé à la résistance à la rifampicine dans 95% des cas, les mutations associées aux résistances des antituberculeux sont multiples, affectant aussi bien les protéines ciblées par les molécules, que les protéines impliquées dans leur activation. Par ailleurs, cette richesse dans l'adaptation génétique de *M. tuberculosis* aux différentes molécules auxquelles elle est confrontée rend difficile le développement de tests

moléculaires de résistance sûrs [59] comme le GeneXpert MTB/RIF, promu par l'OMS.

1.10 La recherche d'antituberculeux aujourd'hui

Dans le but d'avoir un effet significatif sur l'épidémie, trois objectifs majeurs sont mis en première ligne : i) raccourcir la longueur du traitement. Le traitement a une durée minimale de 6 mois, induisant des défauts d'observance et des pertes de suivi des patients. La diminution du temps de traitement revient en grande partie à cibler les bactéries dormantes ; ii) diminuer la toxicité des molécules ; iii) identifier et comprendre les interactions entre les antirétroviraux (ARV) utilisés dans le traitement du VIH/SIDA et les traitements antituberculeux [1]. Etant donné la synergie entre les deux épidémies, et entre les effets indésirables des traitements, un intérêt spécifique est nécessaire.

La plupart des molécules utilisées pour traiter une tuberculose ont été découvertes il y a une cinquantaine d'années. Ces traitements ont été développés à partir de molécules naturelles criblées pour l'inhibition de croissance de la bactérie. Il a d'ailleurs fallu plusieurs années, voire dizaines d'années, avant d'identifier la cible cellulaire de certains antituberculeux [37, 39, 40].

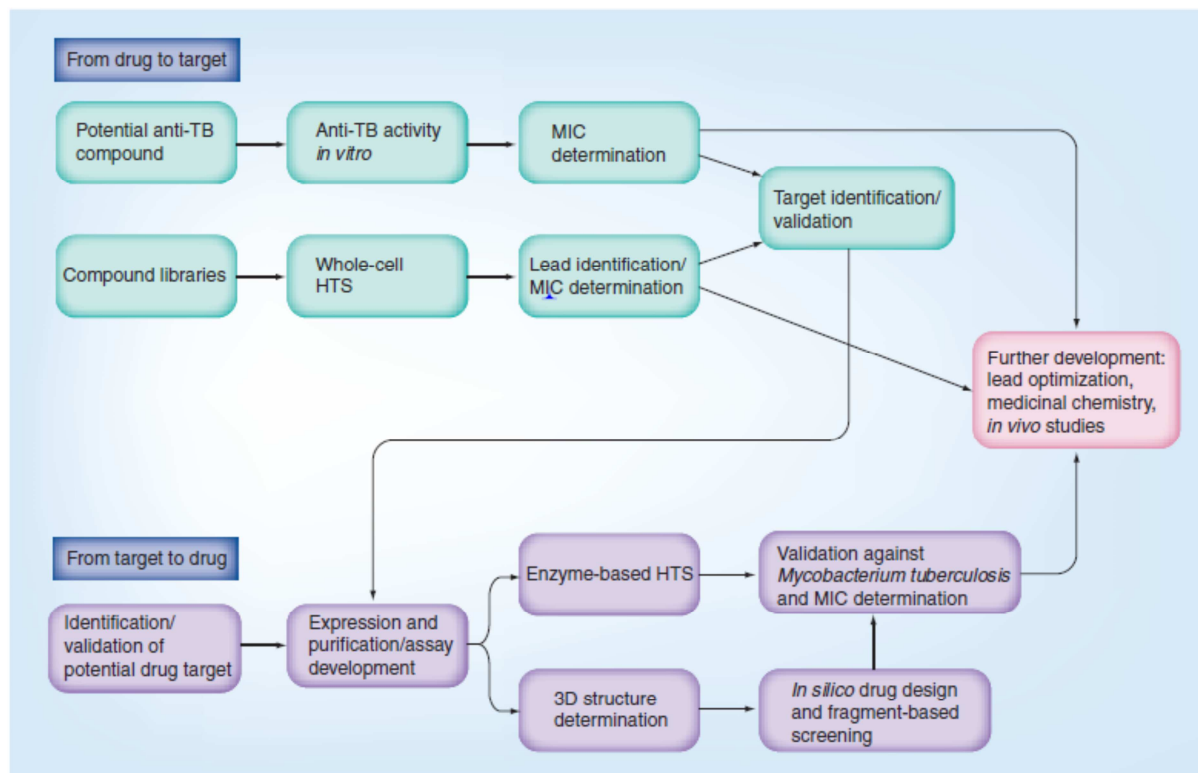


Figure 1-8 : Les différentes stratégies de conception préclinique d'antituberculeux. D'après Sala et Hartkoorn. 2011 [60].

Cette stratégie est désignée par **drug-to-target** (Figure 1-8), littéralement, de la molécule à la cible. Elle consiste à cribler les molécules directement sur les bactéries en cultures. Cependant, en absence de cible identifiée, il est difficile d'optimiser l'activité des molécules de manière rationnelle. De plus, en fonction des conditions de croissance et de la composition du milieu de culture, les expressions de certaines voies métaboliques dans *Mtb* sont différentes, et cela a donné lieu à certaines déceptions [61]. Dans cet exemple, Pethe et al criblent des molécules à la recherche de nouveaux antituberculeux. Ils identifient des dérivés de pyrimidine-imidazole, efficaces sur des cultures de *Mtb*, mais qui ne présentent aucun effet dans un modèle infectieux. Il s'est avéré que les

molécules qu'ils avaient identifiées ciblent le métabolisme du glycérol qui n'est pas sollicité lors de l'infection. Ils mettent d'ailleurs en avant la nécessité de mieux caractériser les voies métaboliques utilisées par la bactérie lors de l'infection afin que les milieux de cultures soient adaptés.

Avec le séquençage du génome de *Mtb* en 1998, beaucoup d'espoir était porté sur l'identification de nouvelles cibles essentielles dans la bactérie, et au développement rationnel d'inhibiteurs spécifiques de celles-ci. Cette stratégie est désigné **target-to-drug** (Figure 1-8) ou de la cible à la molécule. Cette approche nécessite d'abord la validation de la cible envisagée comme essentielle à *Mtb* dans un contexte infectieux.

La cible doit également être « **druggable** », une cible pour laquelle la probabilité de développer une petite molécule pouvant perturber son activité est acceptable [62, 63]. Des données de séquence, structure ou des données biochimiques peuvent indiquer si une protéine est susceptible d'être inhibée par une petite molécule drug-like [64, 65]. Les interactions protéine-protéine, par exemple, se font souvent sur des surfaces planes et/ou hydrophobes entre les protéines. Cette configuration est plus difficile à cibler par de petites molécules drug-like « classiques » et nécessitent une approche spécifique [66].

Enfin, il s'est avéré difficile de convertir une efficacité *in vitro* (IC₅₀) en efficacité *in vivo* (MIC). Identifier un nouvel inhibiteur pour une enzyme *in vitro* est déjà un défi en soi, mais les inhibiteurs développés *in vitro* n'ont parfois peu

ou pas d'activité sur la bactérie entière, avec ses barrières et ses défenses [12]. Cela peut être dû à la biodisponibilité des molécules *in vivo*, leur inactivation, leur efflux hors de la cellule, ou à une fixation non-spécifique dans *Mtb* qui serait sans conséquences sur la croissance [67].

En résumé, l'approche drug-to-target prend en compte les aspects de biodisponibilité, toxicité et d'efficacité sur la bactérie mais l'optimisation des molécules est limitée en absence de cible identifiée ; tandis que la stratégie target-to-drug incorpore les données biochimiques et peut rapidement produire des inhibiteurs très efficaces, cependant elle néglige les aspects de biodisponibilité et de spécificité *in vivo* des molécules.

L'urgence à développer de nouveaux antituberculeux amène donc la recherche à déployer une stratégie combinée, se basant sur un criblage pour des inhibiteurs de croissance bactérienne d'abord, d'identification de(s) cible(s) cellulaire(s), et enfin d'optimisation des molécules grâce aux données biochimiques (structure, activité enzymatique) [60, 68].

Cette approche combine les avantages des deux stratégies. Le premier crible prend en compte la biodisponibilité des molécules et l'effet sur la bactérie dans son ensemble, et est également capable d'intégrer la cytotoxicité des molécules, si les cultures de *Mtb* sont faites directement dans des macrophages par exemple [69]. Le second prend en compte les données moléculaires afin d'optimiser l'activité des molécules sur leur(s) cible(s) [70].

Dans le cadre de ma thèse, puisque nous disposons d'une excellente cible, la thymidylate synthase ThyX de *Mtb*, nous avons réalisé une approche target-to-drug. Dans un premier temps, nous allons nous attarder sur la validation de ThyX en tant que cible pertinente dans *Mtb*. Dans un second temps, nous nous intéresseront aux aspects biochimiques et fondamentaux des thymidylate synthase, et plus particulièrement de ThyX.

1.11 Mécanisme d'inhibition de la synthèse de thymidylate dans *Mtb*

La déoxythymidine monophosphate (dTMP), ou thymidylate, est un précurseur essentiel de la réplication et de la réparation de l'ADN. Dans une cellule, il peut être i) prélevé du milieu sous forme de thymidine avant d'être phosphorylé, ce qui nécessite une thymidine kinase, ou ii) être néo-synthétisé ce qui nécessite une thymidylate synthase.

L'activité des thymidylate synthases *in vivo* est étroitement liée au cycle des folates. Les folates sont des métabolites essentiels impliqués dans le transfert d'unités monocarbonées, notamment dans les voies de synthèse *de novo* d'acides nucléiques (comme le dTMP) et de certains acides aminés.

Mtb ne possède pas de thymidine kinase et ne peut donc pas utiliser la thymidine exogène [71, 72]. *Mtb* s'appuie donc uniquement sur la synthèse *de novo* de dTMP afin d'assurer un stock suffisant à la réplication et réparation de

son ADN. Il existe deux familles de thymidylate synthases, toutes deux présentes chez *Mtb* : ThyX (EC 2.1.1.148) et ThyA (EC 2.1.1.45).

Deux molécules utilisées aujourd'hui, ciblent le métabolisme des folates et la synthèse de thymidylate dans *Mtb* :

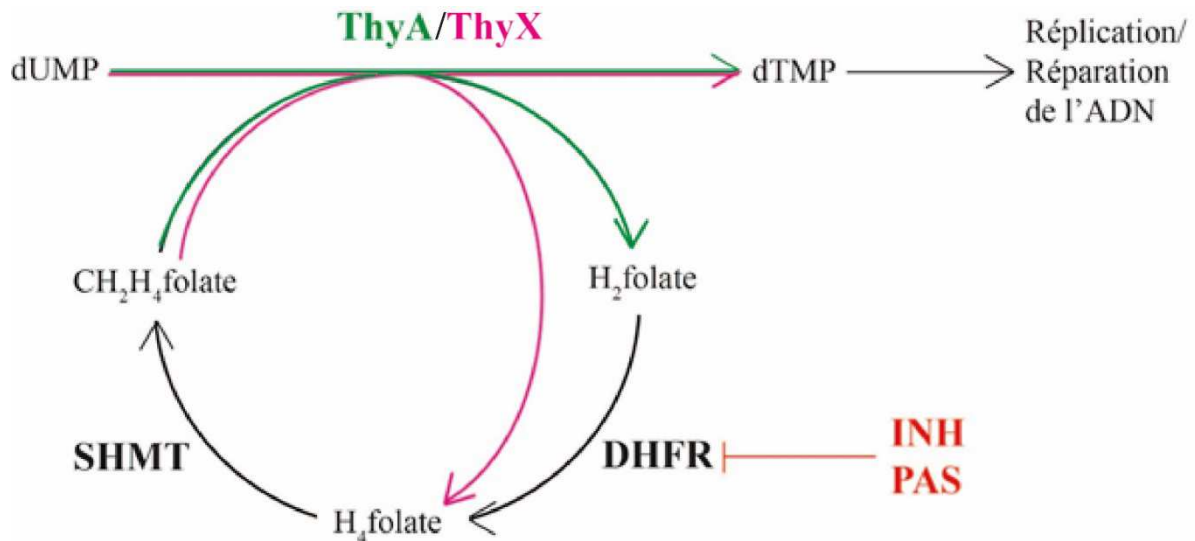


Figure 1-9 : Schéma des cibles de l'isoniazide (INH) et de l'acide para-amino-salicylique (PAS) dans le métabolisme de synthèse du dTMP et la voie parallèle via ThyX mise en place dans *Mtb*. INH : isoniazide. PAS : acide para-aminosalicylique. DHFR : dihydrofolate réductase. SHMT : sérine hydroxyméthyl transférase.

L'isoniazide (INH) est une prodrogue dont la forme active INH-NADPH, inhibe la DHFR de *Mtb*, et donc la synthèse de dTMP par ThyA (Fig. 1-9).

L'acide para-amino-salicylique (PAS) est également une prodrogue dont la forme active cible, entre autres, le métabolisme des folates (DHFR et DHFS). Une mutation inactivant ThyA est retrouvée dans plus d'un tiers des souches résistantes au PAS (Fig. 1-9).

Cependant, aucune de ces molécules ne ciblent ThyX, la thymidylate synthase flavine-dépendante. Il a été confirmé que ThyX était nécessaire et suffisante à la croissance de *Mtb* tandis qu'une délétion de *thyA* présente un phénotype sauvage [44]. La synthèse de dTMP par ThyX produit du H₄folate et non du H₂folate, c'est pourquoi l'activité de ThyX n'est pas liée à celle de la DHFR *in vivo*.

De ce fait, si la perte de fonction de ThyA a été associée à la résistance au PAS [44, 73], ThyX a été identifiée comme une voie alternative dans le mécanisme de résistance au PAS [42].

En 2013, une mutation dans le promoteur du gène de ThyX a été associée aux souches résistantes de *Mtb* (MDR et XDR). Des études approfondies ont révélées que cette mutation induisait la surexpression de *thyX* dans les souches MDR et XDR [74]. Une mutation dans le promoteur du gène *thyX* a également été identifiée dans des souches prélevées chez un même patient à différents temps après le début de son traitement dans le but d'étudier le mécanisme d'acquisition de résistance [75].

Ces résultats suggèrent qu'une perte de fonction de ThyA induit la résistance au PAS [42, 44, 73] et que la surexpression de *thyX* compense le besoin en synthèse de thymidylate pour ces souches [42, 74, 75]. Ces éléments font de ThyX une cible de choix dans *Mtb*, particulièrement dans le cas des souches MDR et XDR.

Nous avons récemment montré que cibler ThyX dans *Helicobacter pylori* est une stratégie valide de développement d'antibactérien (Annexe 1, [76]). La voie de synthèse du thymidylate est déjà ciblée par des antituberculeux mais ceux-ci ne visent pas ThyX. Par conséquent, cibler ThyX dans *Mtb* peut avoir un effet synergique avec l'inhibition de ThyA et/ou de la DHFR [77-79], ce qui nous conforte dans notre objectif de cibler la ThyX de *Mtb* par une approche target-to-drug.

Une telle approche implique une connaissance biochimique approfondie de la cible. Nous allons donc nous attarder sur les thymidylate synthase, leur structure, fonction, mécanisme et inhibition.

1.12 Les thymidylate synthase ThyX et ThyA dans *M. tuberculosis* :

La voie des thymidylate synthases est essentielle à la prolifération cellulaire, c'est pourquoi elle est ciblée par nombre de molécules thérapeutiques, aussi bien dans le traitement de la tuberculose que dans le cadre d'autres infections bactériennes ou en chimiothérapie anticancéreuse (fluoro-uracile, méthotrexate).

L'initiation de la réplication de l'ADN en absence de dTTP (déoxythymidine triphosphate) induit des cassures doubles brins ainsi que des trous simple brin au niveau de l'origine de réplication. Ces erreurs provoquent la dégradation des origines de réplication et la mort cellulaire par un processus appelé «thymineless death» [80, 81].

Mycobacterium tuberculosis possède les deux familles de thymidylate synthases : ThyA, la thymidylate synthase canonique, retrouvée dans les trois règnes du vivant, et ThyX, thymidylate synthase alternative, qui se retrouve principalement chez les bactéries ($\approx 30\%$) et les archées. Ces deux enzymes sont responsables de la synthèse *de novo* de dTMP *in vivo*.

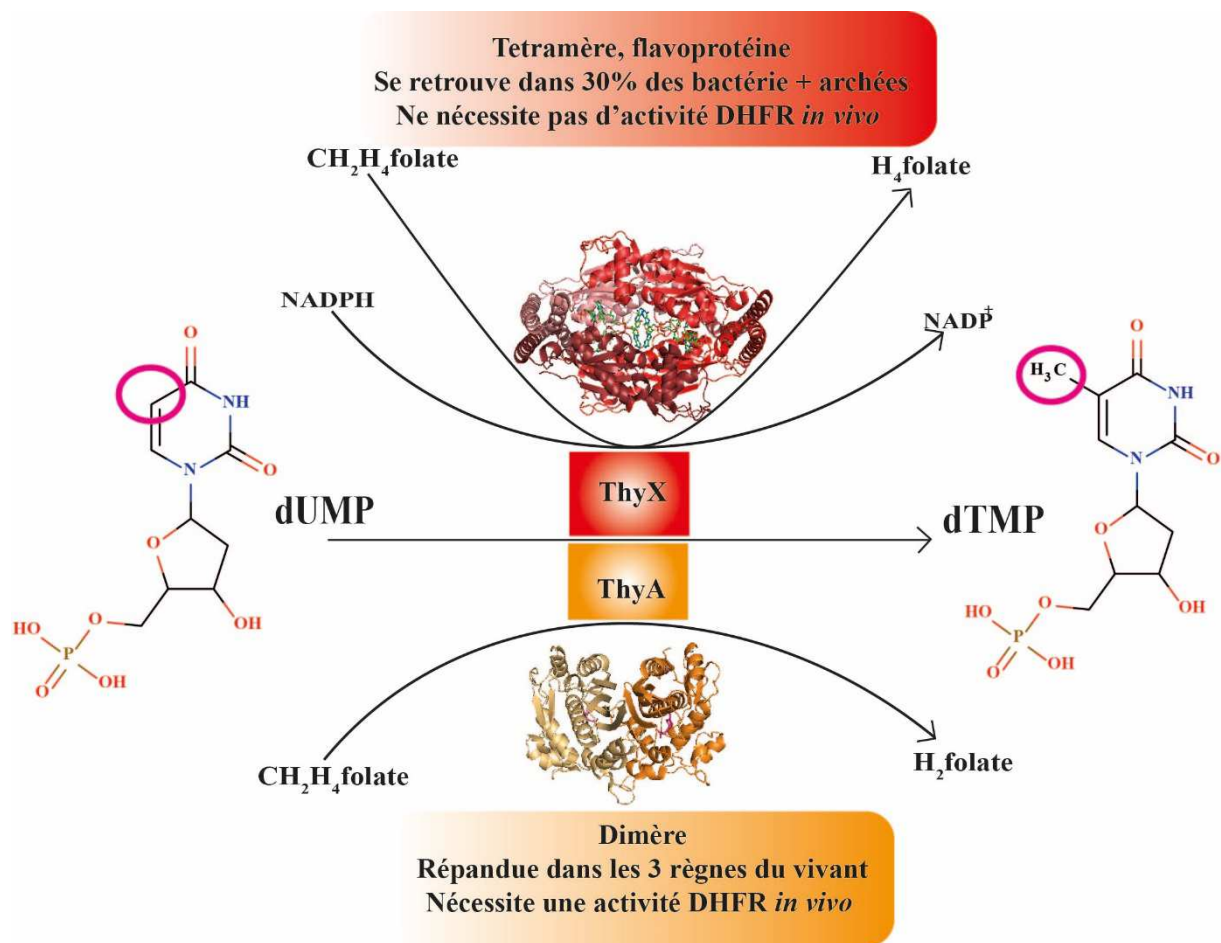


Figure 1-10 : Les thymidylate synthases ThyX (rouge) et ThyA (orange) de *Mycobacterium tuberculosis*, leurs substrats et produits.

La présence des deux familles de thymidylate synthase est spécifique des *Corynebacterineae*. Mis à part quelques exceptions, ces deux familles présentent

une distribution exclusive dans le vivant, avec d'une part le couple ThyA/DHFR et d'autre part ThyX.

Tableau 1 : Liste non exhaustive d'organismes pathogène qui possèdent ThyX, ThyA, DHFR et/ou Tdk. DHFR : Dihydrofolate Réductase. Tdk : Thymidine kinase.

Espèce	ThyA	DHFR	Tdk	ThyX	Commentaire
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	+	+	-	+	Tuberculose
<i>Mycobacterium leprae</i>	+	+	-	+	Lèpre
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	-	-	+	Intoxication alimentaire
<i>Rickettsia prowazekii</i>	-	-	-	+	Typhus
<i>Treponema pallidum</i>	-	-	-	+	Syphilis
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	+	-	+	Chlamydia
<i>Helicobacter pylori</i>	-	-	-	+	Ulcère, cancer gastrique
<i>Homo sapiens</i>	+	+	+	-	

La synthèse de thymidylate consiste en un transfert de carbone vers le dUMP en position 5 de l'anneau pyrimidique (figure 1-10) : un méthylène est

d'abord transféré sur le dUMP puis un hydrure est transféré sur le méthylène afin de le réduire en méthyle. Les deux familles d'enzymes qui catalysent cette réaction suivent ce principe, mais présentent des structures ainsi que mécanismes enzymatiques très différents.

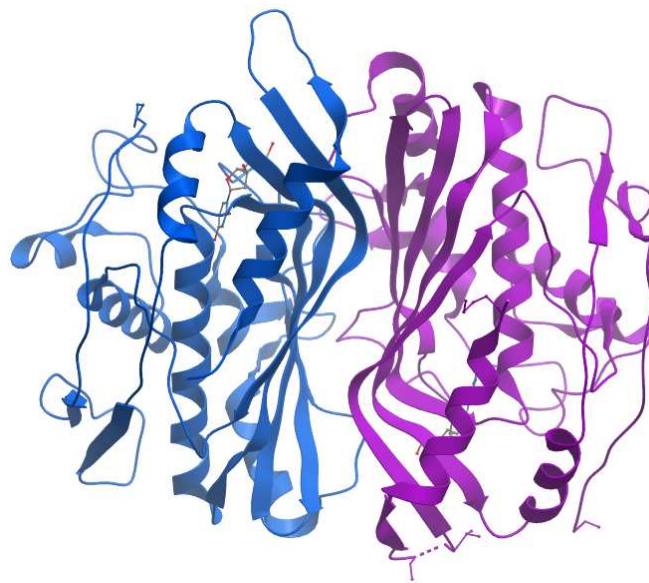


Figure 1-11 : Structure de la Thymidylate synthase ThyA de *Mycobacterium tuberculosis*. Image réalisée avec MolSoft, PDB : 4FOA

1.12.1 ThyA, la thymidylate synthase « classique »

ThyA est la thymidylate synthase la plus répandue dans les trois règnes du vivant et la mieux caractérisée. Dans *Mtb*, il s'agit d'une protéine de 30 kDa, active sous forme de dimère (Fig. 1-11).

Elle utilise le $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$ à la fois comme donneur de méthylène et d'hydrure afin de synthétiser le dTMP :



Le mécanisme chimique de ThyA est bien décrit et très conservé.

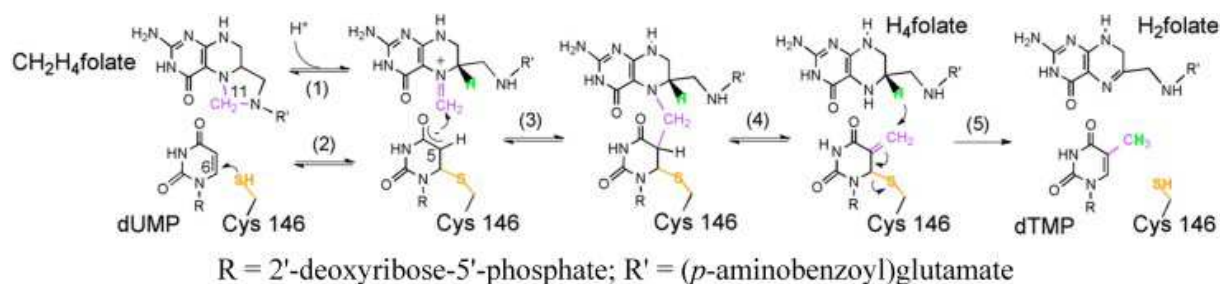
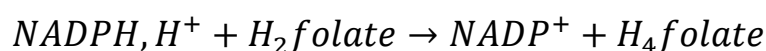


Figure 1-12 : Mécanisme enzymatique de ThyA. D'après Abeysinghe et al. *Int J of Mol Sciences*. 2015 [82].

Dans un premier temps, une cystéine catalytique réalise une attaque nucléophile sur le carbone 6 du dUMP, établissant une liaison covalente avec le substrat par addition michaélienne (Figure 1-12, étape 2). En résulte un énol en position 4 du noyau pyrimidique qui réagit avec l'imine en N5 du CH₂H₄folate (Figure 1-12, étape 1) formant un intermédiaire dUMP-CH₂-H₄folate (Figure 1-12, étape 3). S'en suit la β-élimination du produit transitoire, H₄folate. Le H₄folate transfère à son tour un hydruure qui réduit le groupement méthylène du CH₂dUMP, en méthyle (Figure 1-12, étape 4). Cela a pour conséquence de briser la liaison covalente entre le dUMP et l'enzyme, libérant ThyA, le H₂folate et le dTMP (Figure 1-12, étape 5) [83].

Dans la cellule, ThyA et la DHFR forment un couple métabolique (d'où leur distribution couplée dans le vivant, tableau 1). La DHFR réalise la réaction suivante :



L'activité DHFR est essentielle au recyclage du folate oxydé, produit de ThyA, en H₄folate qui peut à nouveau entrer dans le cycle des folates. Sans activité DHFR, le stock cellulaire de folates réduits est déplété par ThyA ce qui induit la mort cellulaire.

1.12.2 ThyX, Thymidylate synthase « alternative »

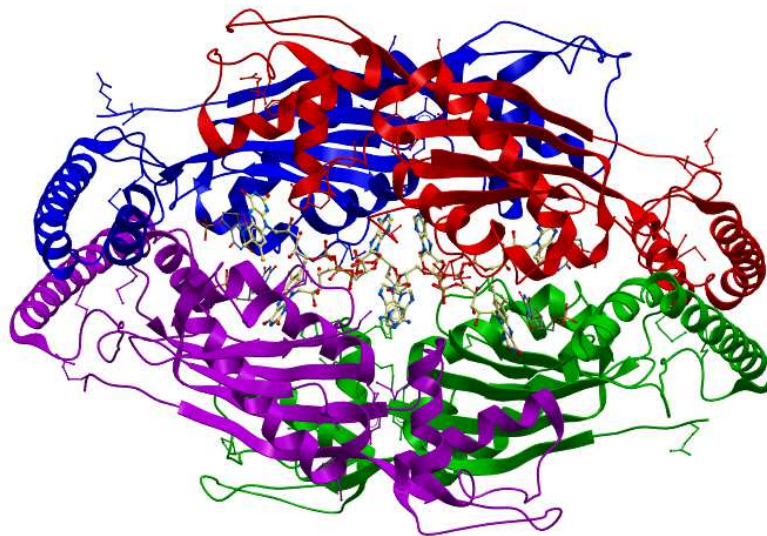
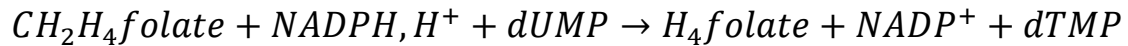


Figure 1-13 : Structure de la Thymidylate synthase ThyX de *Mycobacterium tuberculosis* en présence de FAD et de BrdUMP. Image réalisée avec MolSoft, PDB : 2AF6.

ThyX est une thymidylate synthase flavine-dépendante découverte par H. Myllykallio en 2002 [71] qui se retrouve quasi-exclusivement chez les procaryotes. Dans *Mtb*, il s'agit d'une protéine de 27 kDa active sous forme d'un tétramère de 108 kDa (Fig. 1-13). Les quatre sites actifs se trouvent chacun à l'interface de trois sous unités [84] où est enfouie une molécule de FAD (Flavine Adenine Dinucléotide), cofacteur essentiel à l'activité de ThyX. Un motif RHRX₇SXRY [71, 84] a été identifié comme spécifique de ThyX et a été

étendu à (Y/W)X₁₉₋₄₀HX₂₅₋₂₈RHRX₇₋₈SXR(Y/F)X₆₈₋₁₁₄R par une étude quasi-exhaustive de mutagenèse dirigée rélisée sur ThyX *Mtb* [85]. Ces résidus sont surtout impliqués dans la fixation du dUMP et du FAD.

ThyX catalyse la réaction suivante :



Comme ThyA, elle utilise le CH₂H₄folate comme donneur de méthylène mais utilise le NADPH comme donneur d'hydrure. ThyX produit du H₄folate, s'affranchissant ainsi du besoin en activité DHFR *in vivo*. Cela explique pourquoi les organismes qui utilisent ThyX ne portent généralement pas le gène *folA* qui code la DHFR.

Il est d'usage de parler de partie réductrice et oxydative pour la réaction catalysée par ThyX (Fig 1-14), ces termes faisant référence à l'état d'oxydoréduction de la flavine au cours de la réaction.

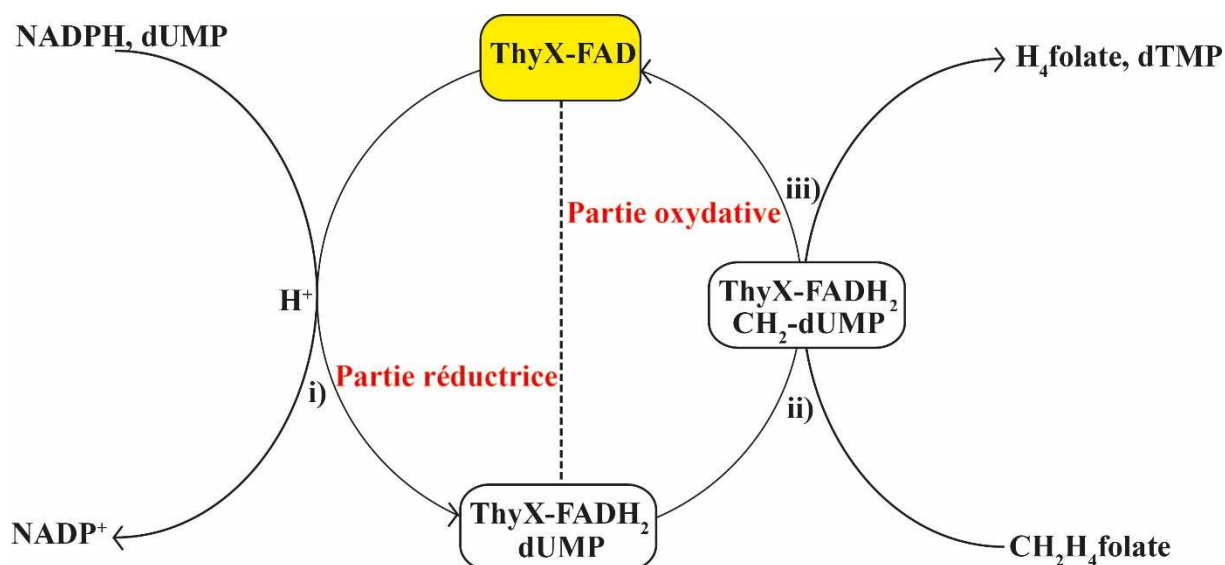


Figure 1-14 : Schéma simplifié des différentes étapes du mécanisme de ThyX. i) Le NAD(P)H et le dUMP se fixent d'abord sur ThyX-FAD. Le NAD(P)H transfère un hydrure vers le FAD qui devient FADH₂ et le NAD(P)⁺ quitte le site actif. ii) Le CH₂H₄folate transfère le groupement méthylène sur le dUMP. iii) Le FADH₂ transfère à son tour un hydrure sur le méthylène qui devient méthyle et le H₄folate et le dTMP quitte l'enzyme recyclée en ThyX-FAD.

Durant la catalyse, la flavine accepte l'hydrure du NAD(P)H pour le transférer vers le [5-CH₂]dUMP. Cet intermédiaire de réaction a été identifié par des expériences de quench-flow en conditions acides [86, 87]. Il a plus récemment été montré que l'accumulation de cet intermédiaire précède la réoxydation de la flavine [88]. On peut donc légitimement supposer que le transfert d'hydrure du FADH₂ vers le méthylène se fait après le transfert du CH₂ vers le dUMP.

Nous disposons des structures de plusieurs ThyXs. La ThyX de *Mtb* a été cristallisée en présence de FAD et de BrdUMP [89]. Dans le large site actif, le noyau pyrimidique du dUMP interagit avec la partie isoalloxanine de la flavine

par empilement (π -stacking, figure 1-15) [89] et le dUMP joue le rôle d'activateur pour le premier transfert d'hydrure sans y prendre part [90].

La flavine (FAD) est ancrée dans la protéine par sa moitié adénine-phosphate, mais sa partie réactive (noyau isoalloxazine) est très flexible dans le site actif de ThyX *Mtb* et la fixation du dUMP a pour effet de la stabiliser dans une conformation [91] propice au transfert d'hydrure du NADPH vers le FAD [90].

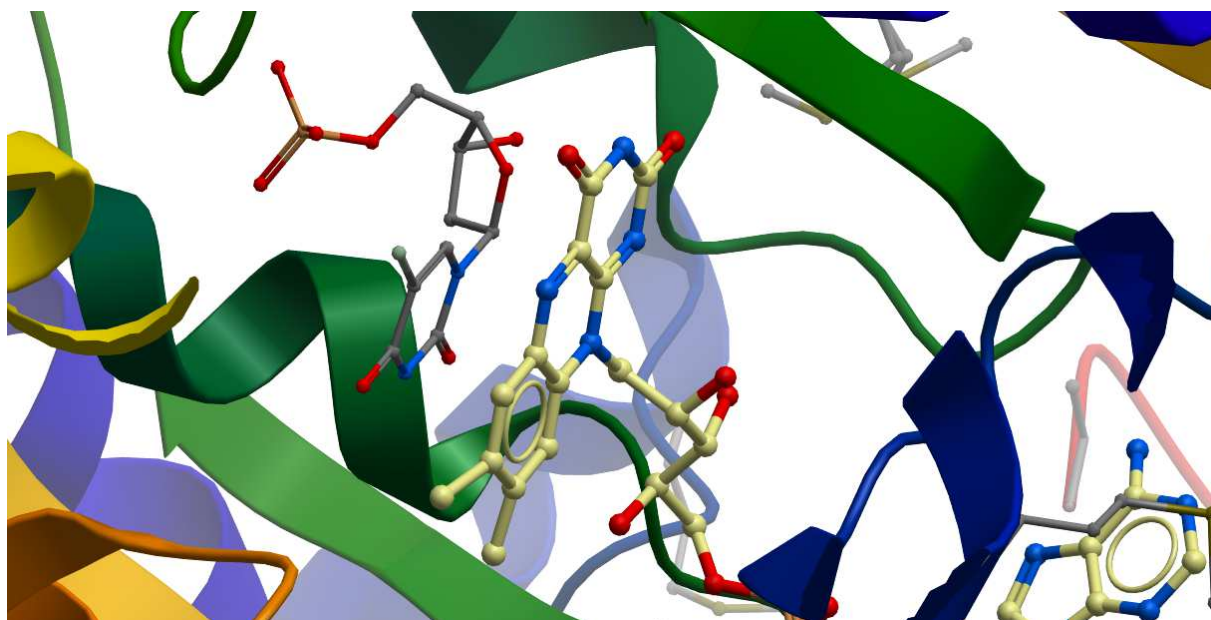


Figure 1-15 : Empilement du FAD et du BrdUMP dans le site actif de ThyX *Mtb*. Image réalisée avec MolSoft, PDB : 2AF6.

La structure de ThyX *Mtb* a également été résolue en présence de NADP⁺ mais s'est révélée être non physiologique car ce ligand expulse le FAD et le BrdUMP du site actif et prend la place du cofacteur FAD. La structure de ThyX *Thermatoga maritima* a été résolue en présence d'acide folique, ce dernier interagit par π -stacking avec le noyau isoalloxazine du FAD, sur le côté opposé

à celui du dUMP. Comme cette fixation est en contradiction avec les modèles mécanistiques, cette structure a également été considérée comme non physiologique par les auteurs [92]. Par conséquent, les informations aujourd'hui disponibles sur les sites de fixation du NADPH et du CH₂H₄folate dans ThyX sont issues des travaux de mutagenèse dirigés et leur relation avec l'activité de l'enzyme [85, 93].

Contrairement à ce qui a été montré pour ThyA, le mécanisme enzymatique de ThyX n'implique pas de cystéine catalytique. Aucun nucléophile impliqué dans l'activation du dUMP n'a pu être identifié à ce jour dans ThyX, et il est aujourd'hui proposé dans la littérature qu'il n'en existe pas [86, 88]. L'activation du dUMP se ferait par une dépolarisation entre le groupement phosphate du dUMP et l'arginine 199 (pour ThyX *Mtb*, R174 pour ThyX *Thermatoga maritima*, [88]) dans le site actif. Cette dernière hypothèse reste encore à prouver.

1.13 Les inhibiteurs de ThyX

Plusieurs classes de molécules ont été identifiées comme inhibiteurs de ThyX avec principalement les naphthoquinones et les analogues de dUMP.

1.13.1 Les naphthoquinones comme inhibiteurs de ThyX

Les naphthoquinones ont été identifiées comme inhibiteurs de la ThyX de *Paramecium Bursaria chlorella virus-1 (PBCV-1)* [94]. Cette enzyme était utilisée comme modèle d'étude de ThyX dans notre laboratoire en raison de sa

facilité de production, purification, et mesure d'activité. Une banque de 2322 petites molécules d'origine naturelle a été criblée et les 1,4-naphthoquinones ont été identifiées comme inhibiteurs des ThyX *PBCV-1*. Une seconde collection de 160 1,4 naphthoquinones a subséquemment été testée et les 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones se sont révélés être les inhibiteurs les plus efficaces, avec une molécule « lead » nommée C8C1. Il a été montré que les dérivés de 2-OH-1,4-Naphthoquinone étaient des inhibiteurs tight-binding compétitifs du sous-site de fixation du dUMP dans le site actif de ThyX. Cela a été confirmé par la co-cristallisation de ThyX *PBCV-1* et C8C1 où l'on voit l'empilement de la flavine et du noyau naphthoquinone de C8C1, en chevauchement avec le site de fixation du dUMP (Fig. 1-16, [94]). C8C1 présente une constante d'inhibition de 300 nM sur ThyX *PBCV-1*.

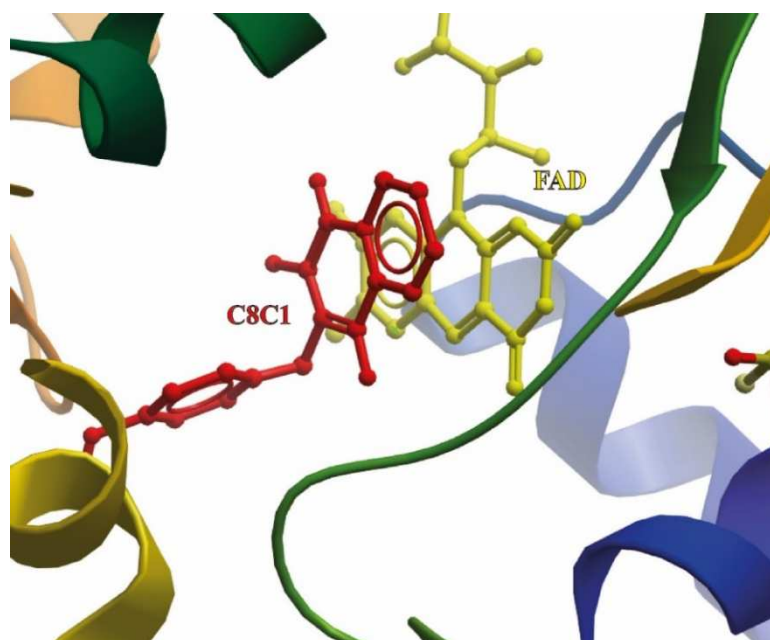


Figure 1-16 : Empilement de C8C1 sur le noyau isoalloxanine de la flavine dans le site actif de ThyX *PBCV-1*. Image réalisée avec MolSoft (code PDB : 4FZB).

Ces études ont été le point de départ de mes travaux sur la ThyX de *Mycobacterium tuberculosis*.

1.13.2 Les naphthoquinones comme molécules thérapeutiques

Les naphthoquinones sont des molécules organiques dérivés du naphthalène. Il leur est souvent prêté une réputation de toxicité pour trois raisons principales : i) elles peuvent réduire le dioxygène et produire des ROS, espèces réactive de l'oxygène, ii) elles peuvent interférer avec la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie et iii) elles peuvent établir des liens covalents avec les nucléophiles exposés sur les protéines, plus particulièrement les cystéines [95, 96] (Fig. 1-17).

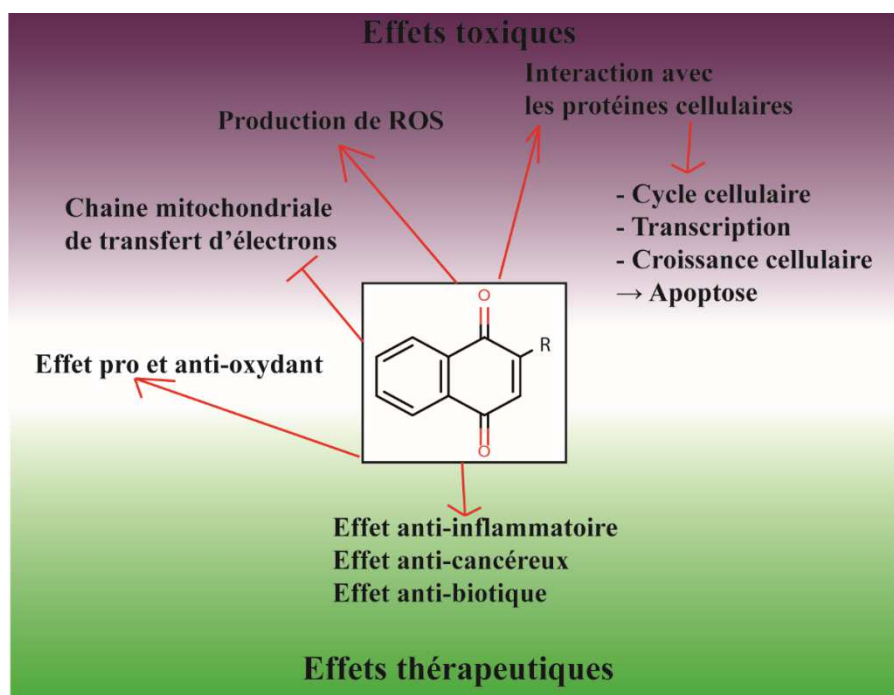


Figure 1-17 : Résumé des effets *in vivo* recensés des dérivés de naphthoquinone.

Mais les 1,4-naphthoquinones restent toujours considérées aujourd'hui dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques en raison de leurs propriétés anti- et pro-inflammatoires [96], anti-cancéreuses [97, 98], et antibiotiques [99, 100] (Fig. 1-17). Une 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone, l'atovaquone, est actuellement utilisée dans le traitement contre le paludisme, démontrant qu'une activité biologique et une toxicité sélective peuvent être atteintes avec cette classe de molécules. Nous avons d'ailleurs récemment montré qu'il était possible de cibler ThyX dans *Helicobacter pylori* avec des 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones non toxiques, et obtenir un effet bactéricide dans un modèle murin d'infection (Annexe 1, [76]).

1.13.3 Les analogues de substrat

Plusieurs autres classes de molécules ont été identifiées comme inhibiteurs de ThyX [101, 102].

Tableau 2 : Des analogues de dUMP ou de CH₂H₄folate, inhibiteurs de ThyX identifiés dans la littérature

Analogue de substrat	ThyX testée	Réf
10-Methyl-5,8-dideazafolate	ThyX <i>PBCV-1</i>	[102]
10-Propargylfolate	ThyX <i>PBCV-1</i>	[102]
8-Aminopurinone deoxyribonucleoside-5'-Phosphate	ThyX <i>PBCV-1</i>	[102]
5-Fluorodeoxyuridine-5'-Monophosphate	ThyX <i>Mtb</i> , <i>PBCV-1</i>	[101, 102]
1843U89 (un analogue de folate)	ThyX <i>Mtb</i>	[101]

Il s'agit là d'analogues de substrats déjà connus pour leur pouvoir inhibiteur sur d'autres enzymes mais qui n'ont pas fait l'objet d'une optimisation spécifique pour l'inhibition de ThyX.

En étudiant la relation Structure-Activité de dérivés du dUMP, des analogues de ce substrat ont spécifiquement été développés afin d'inhiber la thymidylate synthase ThyX de *Mtb* par le Laboratoire de Chimie Médicinale de l'Université Catholique de Louvain.

Il a été montré que le dUMP se retrouvait totalement enfouie dans le site actif de ThyX *Mtb*. Le noyau pyrimidique s'empile sur la flavine et le groupement phosphate interagit avec un grand nombre de résidus dans la poche isolée du milieu (figure 1-15, [89]).

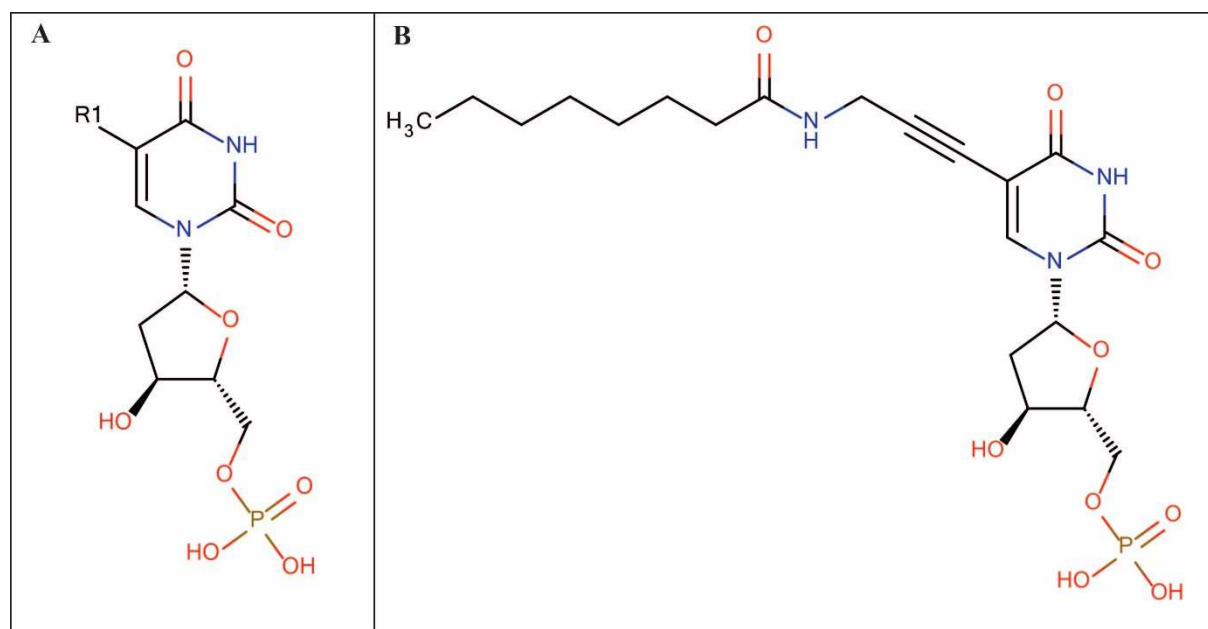


Figure 1-18 : Analogues de dUMP comme inhibiteurs de ThyX *Mtb*. A. dUMP portant une chaîne R₁ en position 5 du noyau pyrimidique. B. un dérivé de 5-alkynyl dUMP qui présente un bon pouvoir inhibiteur contre ThyX *Mtb* (IC₅₀ = 0.91 μM), découvert par Kôgler et al. 2011 [103].

Afin de conserver ces interactions, le dUMP a été modifié en position 5 de la pyrimidine, la position sur laquelle se fait le transfert de carbone, dans le but de bloquer l'activité de l'enzyme.

La molécule la plus active ainsi découverte, un dérivé 5-alkynyl dUMP (Fig. 1-18.B) présente un IC_{50} de 0.91 μ M [103]. A cette étape, cette molécule n'a pas été testée sur la bactérie car la présence du groupement phosphate en fait une molécule trop polaire pour pouvoir diffuser à travers la membrane. Plus récemment, un groupement aryloxy phosphoramidate a été ajouté sur le phosphate de cette molécule. Ce groupement masque le groupement phosphate polaire, ce qui facilite le passage de la molécule à travers la membrane. Il est ensuite excisé dans la cellule par un mécanisme faisant intervenir des enzymes et des étapes spontanées [104]. La prodrogue résultant de cette stratégie a montré un meilleur pouvoir inhibiteur sur *Mtb* en culture comparé à la molécule originale (62.5 μ g/ml contre >250 μ g/ml initialement) [105]. L'optimisation de ces molécules est en cours actuellement.

1.13.4 Les dérivés de benzoyl et de triazole

Les dérivés de benzoyl et de triazole, ont également été identifiés comme inhibiteurs de ThyX *PBCV-1*.

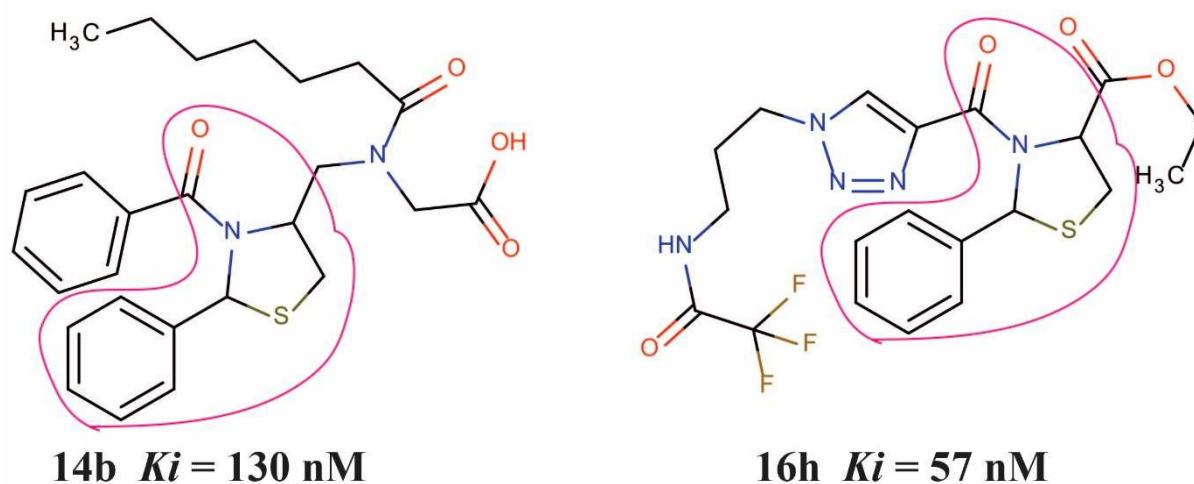


Figure 1-19 : Structure des dérivés benzoyle (gauche, molécule 14b) et triazole (droite, molécule 16h), identifiés comme inhibiteurs de ThyX *PBCV-1*. 14b : 2-{N-[(3-benzoyl-2-phenyl-1,3-thiazolidin-4-yl)methyl]heptanamido}acetic acide. 16h : ethyl-phenyl-3-{1-[3-(trifluoroacetamido)propyl]-1H-1,2,3-triazole-4-carbonyl}-1,3-thiazolidine-4-carboxylate. D'après Onën et al. 2008 [106].

Les molécules 14b et 16h (Fig. 1-19), au plus haut pouvoir inhibiteur, présentent des constantes d'inhibition de 130 et 57 nM, respectivement [106]. L'inhibition de l'activité de ThyX *PBCV-1* par les dérivés de benzoyle (14b, Fig. 1-19) est réversible par l'augmentation de la concentration en dUMP, ce qui suggère un type d'inhibition compétitif tandis que l'inhibition par les dérivés de triazole (16h, Fig. 1-19) est indépendante de la concentration en dUMP. En comparant les structures de 14b et 16h, on peut voir que les groupements ajoutés sur chaque molécule envahissent un espace chimique différent. Il est probable qu'un des groupements ajoutés à la molécule 14b est en chevauchement avec le site de fixation du dUMP.

1.14 Problématique de la thèse

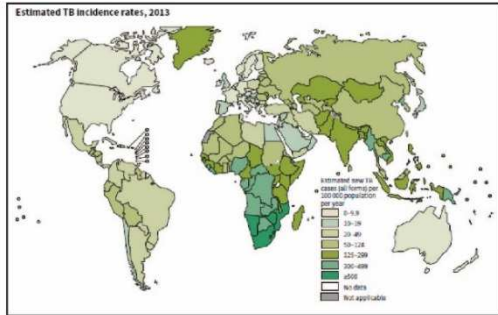
ThyX est une cible potentielle et attractive dans *Mycobacterium tuberculosis*, l'agent étiologique de la tuberculose. Mais la plupart des études sur ThyX se concentrent sur la partie oxydative de la réaction, tandis que l'initiation de la partie réductrice est peu décrite. Or ces informations sont primordiales puisqu'il s'agit de la partie de la réaction qui est inhibée par les 2-hydroxy-1,4-Naphthoquinones découvertes au laboratoire. L'importance du mécanisme est accentuée dans le cas de ThyX car cette enzyme présente i) un mécanisme complexe faisant intervenir plusieurs substrats et un cofacteur en plusieurs étapes et ii) un site actif très flexible au cours de la réaction. Mes recherches se sont donc orientées d'une part sur l'étude de la cinétique du mécanisme de ThyX *Mtb* et d'autre part sur la flexibilité de son site actif dans les interactions qu'il établit avec les différents substrats et inhibiteurs. Cette étude a été réalisée à l'équilibre, et par spectroscopie résolue en temps.

Une seconde partie de mon travail a eu pour objectif d'optimiser les naphthoquinones drug-like pour l'inhibition de la ThyX de *Mtb*. Pour cela, j'ai employé une approche combinée de criblage *in vitro* et *in silico* par la construction d'un modèle pharmacophore d'inhibition de ThyX *Mtb*. Les inhibiteurs identifiés ont été caractérisés et subséquemment testés pour leur pouvoir antimycobactérien sur *Mycobacterium smegmatis*, mycobactérie non-pathogène utilisée comme modèle. Enfin, la sélectivité de ces inhibiteurs

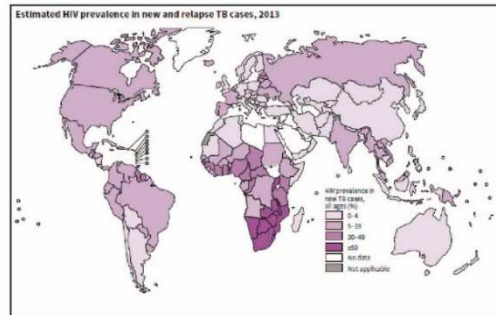
pour ThyX a été estimée directement dans la bactérie pathogène *Mycobacterium tuberculosis*.

1.15 Résumé : Tuberculose, *Mtb*, diagnostique, traitement et résistance

La Tuberculose (TB)



Incidence de TB dans le monde (2013)



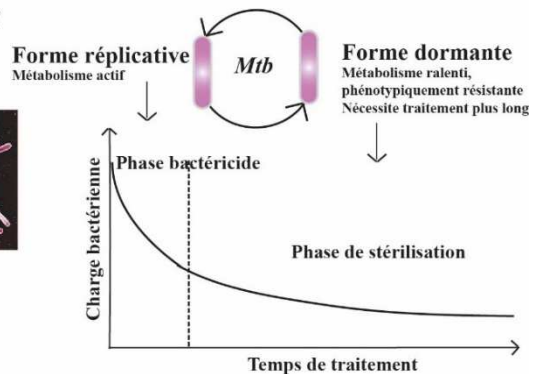
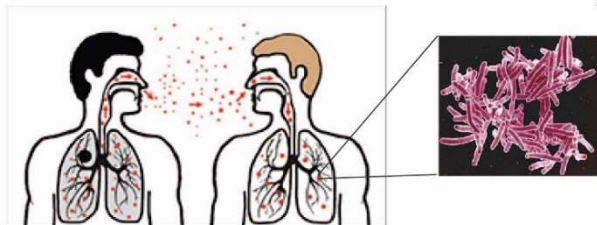
Prevalence du VIH dans les nouveau cas et les récédives de TB

9 millions de nouveaux cas par an
1.5 millions de morts
Epidémie mondiale avec 22 pays à forte charge
1/3 de la population mondiale infectée porte *Mtb*

Co-infection avec le VIH :
25% de des morts du VIH/SIDA sont liés à TB
Toxicité additive des traitements de TB et des ARV

Agent étiologique: *Mycobacterium tuberculosis*

Mtb se transmet sous forme d'aérosol



Diagnostique :



Le traitement dépend du degré de résistance : TB → Test de résistance

Degré de résistance	1 ^{ère} ligne	2 ^{ème} ligne	Durée	Guérison
TB sensible	Isoniazide (INH) Rifampicine (RIF) Pyrazinamide (PZA) Ethambutol (ETH)		6 mois	86%
TB MDR (multirésistante = RIF ^R + INH ^R)		Fluoroquinolone (FQ) Injectables de seconde ligne (Kanamycine, Amikacine, Capreomycine) PAS, Bedaquiline, Delamanid, ...	au moins 20 mois	40-70%
TB XDR (Ultrarésistante = MDR + FQ ^R + [Inj de seconde ligne] ^R)		Pas de traitement standardisé: combinaison adaptée		22%

2. Chapitre II : Mécanisme de ThyX *PBCV-1*

2.1 Introduction

La fonction thymidylate synthase de ThyX a été confirmée *in vitro* par détection par HPLC du produit de la réaction, le dTMP, et *in vivo* par complémentation fonctionnelle de bactéries *E. coli* auxotrophes pour le thymidylate [71, 102]. Cependant nous savons que ThyX, comme beaucoup de flavo-enzymes [107], réagit également *in vitro* avec l'O₂ lors de la réoxydation des flavines, pour produire du H₂O₂, produit qui peut s'avérer toxique *in vivo* [108]. Or nous retrouvons ThyX dans des organismes aérobies strictes ce qui suggère qu'il existe des mécanismes i) à l'échelle de la protéine et/ou ii) à l'échelle de la bactérie qui permettent d'inhiber ou de limiter cette réaction *in vivo*. Dans cette partie, nous considérons la première possibilité c'est-à-dire les mécanismes de régulation de la réaction avec le dioxygène au niveau de la protéine.

Nous nous sommes également intéressés aux différentes interactions transitoires entre les trois substrats (NADPH, dUMP, CH₂H₄Folate) et le cofacteur FAD, dans le site actif de ThyX, que nous avons étudié par spectroscopie résolue en temps.

L'étude a été réalisée sur la ThyX de *Paramecium Bursaria Chlorella Virus (PBCV-1)*, un bon modèle pour une étude cinétique et mécanistique.

PBCV-1 est un virus à ADN double brin qui infecte les algues vertes du genre *Chlorella*. Il se distingue de la plupart des virus car son génome code pour de nombreuses fonctions qui ne sont habituellement pas dans les virus (méthyltransférase d'ADN, endonucléases site-spécifiques, enzymes de glycosylation de protéines, etc) [109]. *PBCV-1* ne possède pas de thymidylate synthase classique ThyA. Toutefois, il porte la thymidylate synthase ThyX la plus active citée à ce jour [102]. ThyX *PBCV-1* est très active (0.25 s^{-1}), sa production et purification aisées, et sa stabilité suffisante pour une étude mécanistique par mélange rapide dans un système d'écoulement arrêté (Stopped-flow). Ces éléments ont motivé le choix de cette enzyme comme modèle d'étude du mécanisme de ThyX d'organismes pathogènes dont l'activité *in vitro* est moins stable (comme la ThyX de *Helicobacter pylori* par exemple) [71, 102].

Ce travail a été entamé avant le début de ma thèse. Ma contribution s'est faite particulièrement sur la réactivité de l'enzyme avec l' O_2 . C'est pourquoi dans ce chapitre, je vous présenterai d'abord la méthode utilisée (le Stopped-Flow), les caractéristiques spectrales qui ont permis d'analyser les résultats, les résultats obtenus en détaillant ma participation, et enfin une discussion générale des conclusions.

2.2 Méthode : Le stopped flow

Le système d'écoulement arrêté ou stopped flow, est une méthode d'étude de réactions rapides (résolution temporelle ms) en solution. Plusieurs méthodes de mesures peuvent être couplées au stopped flow (absorbance, fluorescence, dichroïsme circulaire, etc). Dans nos études, nous l'avons utilisé en mode absorbance pour exploiter simultanément les riches propriétés du spectre de la flavine, cofacteur de ThyX, ainsi que celui du NADPH. Notre appareil (SFM300, Biologic, France) est équipé de fibres optiques qui transmettent la lumière blanche de la source à la cuve puis de la cuve au système spectrographique composé d'une barrette de diodes capable de mesurer des spectres UV-visible toutes les 0,8 ms.

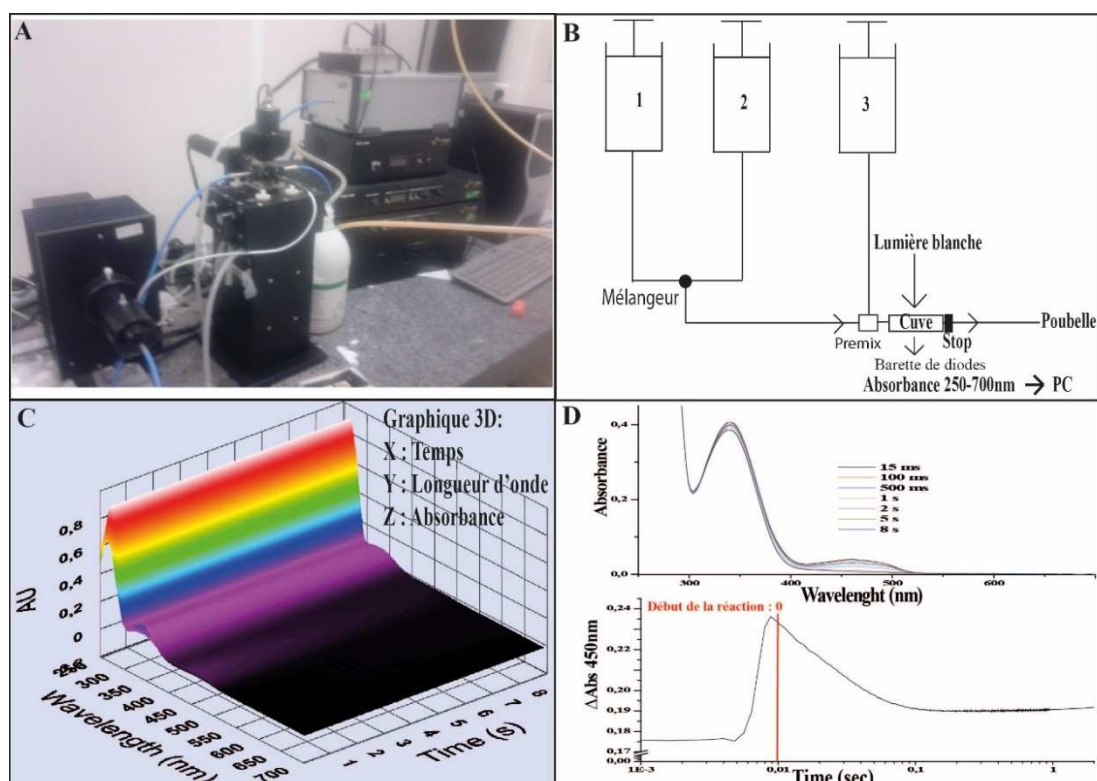


Figure 2-1 : Principe du Stopped-Flow. A. photographie du dispositif Biologic SFM300 équipé d'un détecteur Tidas à barrettes de diodes, utilisé au laboratoire. B. Schéma du circuit interne de l'appareil, permettant de faire les mélanges. C. Résultats obtenus sous forme de graphique 3D, permettant d'exploiter à la fois les cinétiques et les spectres. D. Spectres et cinétique exploitables à partir des résultats de stopped flow. Le temps mort du dispositif est d'environ 1 ms.

Le dispositif (Fig. 2-1.A et 2-1.B) est équipé de trois réservoirs contrôlés indépendamment, dans lesquelles nous plaçons les mélanges réactionnels et du tampon de réaction. Les réservoirs sont reliés à un circuit qui aboutit à une ligne de pré-mélange, et une cellule de mesures. Afin de faire varier une concentration dans le système étudié, nous ajustons le ratio des volumes 1/2/3 injectés dans le circuit (Fig. 2-1.B). La ligne de pré-mélange sert à homogénéiser le mix qui est ensuite transféré vers la cellule de mesure, concrètement, une cuve en quartz. De part et d'autre de la cuve, nous retrouvons nos fibres optiques et notre système spectrographe.

Les résultats obtenus sont sous la forme d'un graphique tridimensionnel Temps-Absorbance-Longueur d'onde (Fig. 2-1.C). Cela nous permet d'exploiter à la fois les changements spectraux et leurs cinétiques. Le temps mort du stopped flow est d'environ 1 ms, qui correspond au temps d'injection du mélange dans la cuve. Nous pouvons voir dans la cinétique dans la figure 2-1.D que le début de la mesure précède le mélange, d'où l'augmentation de l'absorbance à 9ms. Afin de standardiser l'analyse, nous plaçons notre zéro à 10 ms dans toutes les analyses.

2.3 Analyse spectrale

Les principales caractéristiques spectrales qui ont permis l'analyse du mécanisme de ThyX *PBCV-1* sont résumées dans la figure suivante :

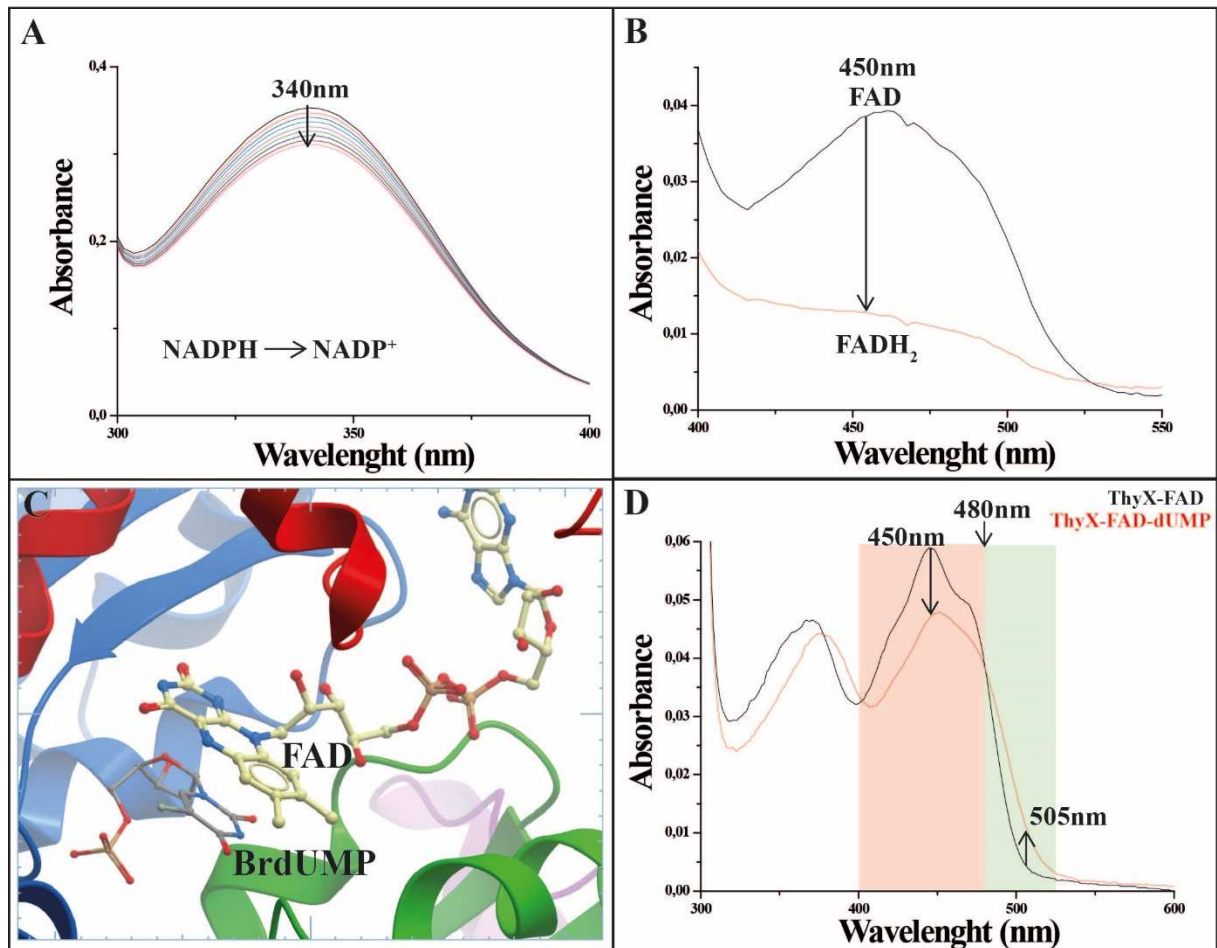


Figure 2-2 : Les caractéristiques spectrales exploitables au cours de la réaction catalysée par ThyX. A. Spectres successifs d'oxydation du NADPH correspondant à la diminution du spectre NADPH. B. Spectre de FAD (noir) et du FADH₂ (rouge). La transition entre l'état oxydé et réduit des flavines est classiquement étudié à 450 nm. C. Empilement du BrdUMP et du noyau isoalloxazine du FAD, dans le site de ThyX *Mtb* (réalisé avec MolSoft, PDB : 2AF6). Le mode de fixation du dUMP est le même dans le site actif de ThyX-*PBCV-1*. D. Spectre de ThyX *PBCV-1*-FAD (400 μM, 50 μM de ThyX-FAD) en absence (noir) et en présence (rouge) de dUMP (500 μM). 480 nm est le point isobestique entre les deux formes. L'absorbance décroît et croît respectivement avant et après 480 nm, après fixation du dUMP à l'enzyme.

Dans la figure 2-2.A, nous pouvons voir le spectre du NADPH. Sous forme réduite, nous observons un pic à 340 nm. Ce dernier disparaît lorsque le

NADPH est oxydé en NADP^+ . De plus, 340 nm est le point isobestique entre la forme oxydée et réduite de la flavine (Fig. 2-2.B). Par conséquent, il n'y a pas de participation du spectre de la flavine à une variation d'absorbance à 340 nm que nous avons donc attribué à l'oxydation du NADPH. Dans la figure 2-2B, je présente le spectre du FAD, flavine oxydée, et du FADH_2 , flavine réduite. L'état d'oxydoréduction des flavines est généralement suivi à 450 nm.

Dans la figure 2-2.C, nous pouvons voir l'empilement du BrdUMP et du FAD dans le site actif de ThyX. Cette interaction induit un changement spectral de la flavine (Fig. 2-2.D). Les spectres sans (noir) et avec (rouge) dUMP se croisent à 480 nm, point isobestique pour la fixation de ce substrat.

En conséquence, une observation à 480 nm permet d'examiner la concentration totale de FAD (avec et sans dUMP). A 450 nm, la fixation du dUMP et la réduction de la flavine induisent tous deux une diminution de l'absorbance tandis qu'à 505 nm, les deux événements induisent respectivement une augmentation et une diminution de l'absorbance. La flavine absorbe très peu à 505 nm en absence de dUMP. Par conséquent, dans la zone verte du spectre, figure 2-2.D, nous observerons majoritairement la forme ThyX-FAD-dUMP. La zone en rouge cependant, ne permettra pas de distinguer les flavines avec et sans dUMP.

2.4 Résultats

Substrate interaction dynamics and oxygen control in the active site of thymidylate synthase ThyX

Hubert F. BECKER*†‡, Kamel DJAOUT*†, Isabelle LAMARRE*†, Jonathan E. ULMER*†, Delphine SCHAMING§, Véronique BALLAND§, Ursula LIEBL*†, Hannu MYLLYKALLIO*† and Marten H. VOS*†¹

*Laboratory for Optics and Biosciences, CNRS Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau, France

†INSERM U696, 91128 Palaiseau, France

‡UPMC Univ Paris 06, 75005 Paris, France

§Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire, UMR CNRS 7591, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 15, rue Jean-Antoine de Baïf, 75205 Paris Cedex 13, France

Thymidylate synthase ThyX, required for DNA synthesis in many pathogenic bacteria, is considered a promising antimicrobial target. It binds FAD and three substrates, producing dTMP (2-deoxythymidine-5-monophosphate) from dUMP (2-deoxyuridine-5-monophosphate). However, ThyX proteins also act as NADPH oxidase by reacting directly with O₂. In the present study we investigated the dynamic interplay between the substrates and their role in competing with this wasteful and potentially harmful oxidase reaction in catalytically efficient ThyX from *Paramecium bursaria* Chlorella virus-1. dUMP binding accelerates the O₂-insensitive half-reaction between NADPH and FAD by over four orders of magnitude to ~30 s⁻¹. Thus, although dUMP does not have a direct role in FAD reduction, any turnover with molecular O₂ requires its presence. Inversely, NADPH accommodation accelerates dUMP binding ~3-fold

and apparently precedes dUMP binding under physiological conditions. In the oxidative half-reaction, excess CH₂H₄folate (N⁵,N¹⁰-methylene-5,6,7,8-tetrahydrofolate) was found to re-oxidize FADH₂ within 1 ms, thus very efficiently competing with FADH₂ oxidation by O₂ (1.5 s⁻¹ under aerobic conditions). The resulting reaction scheme points out how the interplay between the fast reactions with the native substrates, although not rate-limiting for overall catalysis, avoids NADPH oxidase activity in aerobic micro-organisms, including many pathogens. These observations also explain why ThyX proteins are also present in aerobic micro-organisms.

Key words: enzyme kinetics, flavin, molecular evolution, stopped flow, thymidylate synthase, time-resolved spectroscopy.

INTRODUCTION

Nature has established two structurally unrelated enzyme families, dubbed ThyA and ThyX, that form dTMP (2-deoxythymidine-5-monophosphate), an essential DNA precursor [1]. The key mechanistic difference between these non-orthologous enzyme families lies in their redox chemistry. ThyA proteins catalyse reductive methylation of dUMP (2-deoxyuridine-5-monophosphate) to dTMP using CH₂H₄folate (N⁵,N¹⁰-methylene-5,6,7,8-tetrahydrofolate) as both a carbon donor and reductant. In contrast, ThyX proteins from prokaryotes and viral sources are flavoproteins that use the NADPH/FADH₂ couple as a hydride source to reduce a methylene moiety of CH₂H₄folate to form dTMP [2–5]. As FADH₂ is sensitive to the presence of molecular dioxygen [6] and ThyX proteins have substantial NADPH oxidase activity [3,7,8], it has been speculated that ThyX proteins are used preferentially under anaerobic or microaerophilic conditions [9]. However, we have recently discovered that the majority (~65%) of ThyX-carrying species are either strict or facultative aerobes, raising the possibility that ThyX proteins use, to date, unexplored strategies to prevent or hinder turnover with molecular O₂ to favour the physiologically relevant dTMP-forming reaction. This is of fundamental importance, as turnover with oxygen would result in formation of H₂O₂ and activation of the microbial defence against oxidative stress, particularly in actively dividing cells.

Very little is known regarding the transient interplay of the different substrates and the FAD cofactor at the active site of ThyX proteins. Such interactions are of high interest as substrate binding brings about essential conformational changes during ThyX catalysis that may influence O₂ reactivity or turnover of ThyX proteins under aerobic conditions. From measurements at equilibrium performed using ThyX proteins from either PBCV-1 (*Paramecium bursaria* Chlorella virus-1) or *Thermotoga maritima*, consensus emerged that the early chemical step in the ThyX reaction cycle is the reduction of FAD to FADH₂ by hydride transfer from NADPH (reductive half-reaction) [2,3,10,11]. Subsequently, CH₂H₄folate binds close to FADH₂ and triggers the transfer of a methylene moiety from CH₂H₄folate to dUMP [5,12,13]. The transferred methylene is subsequently converted into a methyl group by hydride transfer from FADH₂ (oxidative half-reaction), resulting in flavin oxidation and dTMP formation. Whereas dUMP presumably undergoes chemical modification only after FAD reduction, the binding order and kinetics of the nucleotide substrates remain controversial. Previous work has suggested that dUMP either accelerates FAD reduction by NADPH [3] or, alternatively, may only participate in the FAD re-oxidation reaction [7]. Turnover rates and catalytic efficiencies of ThyX proteins are substantially lower than the corresponding rates measured for ThyA proteins. The highest *k*_{cat} value reported for ThyX proteins of 0.25 s⁻¹ (PBCV-1 enzyme) is an order of magnitude smaller than reported for bacterial ThyA proteins [14].

Abbreviations: CH₂H₄folate, N⁵,N¹⁰-methylene-5,6,7,8-tetrahydrofolate; dTMP, 2-deoxythymidine-5-monophosphate; dUMP, 2-deoxyuridine-5-monophosphate; MetF, methylenetetrahydrofolate reductase; MTHF, 5,10-methylenetetrahydrofolate; NHE, normal hydrogen electrode; PBCV-1, *Paramecium bursaria* Chlorella virus-1.

¹ To whom correspondence should be addressed (email marten.vos@polytechnique.edu).

However, as this value was measured under normoxic conditions and the degree of re-oxidation of FADH₂ by O₂ (instead of CH₂H₄folate) was not accounted for, the actual rate-limiting steps of ThyX catalysis remain poorly characterized.

In the present study we take advantage of spectral features of ThyX from PBCV-1 that make this viral protein suitable for rapid-mixing time-resolved experiments to investigate ThyX ligand binding and redox chemistry. ThyX from PBCV-1 provides a robust model for understanding the functioning of more fragile ThyX proteins from pathogenic species. We use stopped-flow transient-absorption spectroscopy to investigate the transient dynamics of flavin substrate binding and flavin reduction and re-oxidation under anaerobic and aerobic conditions. Our new findings reveal a dual role of dUMP, first as essential activator (reductive half cycle) and then as substrate (oxidative half cycle). The present study also establishes clearly that a complex interplay of dUMP and NADPH in the vicinity of the FAD cofactor is necessary for formation of a transient ternary complex (dUMP–NADPH–ThyX) that enables FAD reduction. We also show that flavin re-oxidation in the presence of CH₂H₄folate intrinsically occurs fast (<1 ms), and efficiently competes with flavin oxidation by molecular O₂, thus implying that the redox chemistry of ThyX proteins is not rate-limiting even under aerobic conditions. These kinetic measurements therefore provide a highly feasible explanation why ThyX proteins are not eliminated from aerobic micro-organisms.

Our observations have important implications for the ThyX reaction mechanism, and more generally point at the important role of substrate–substrate and substrate–cofactor interactions in positioning the enzyme complex for its catalytic function.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

The PBCV-1 ThyX enzyme was expressed and purified following a previously described protocol [3] and stored at –80 °C in 30 mM Hepes (pH 8), 150 mM NaCl and 10% glycerol. The flavin content of the ThyX protein was estimated from the FAD absorbance maximum at 448 nm and the protein concentration using the Bradford assay. As in all isolated ThyX solutions, the FAD content was substoichiometric, for the PBCV-1 enzyme typically 0.7 per tetramer. No external flavin was added. Samples were prepared in 30 mM Hepes buffer (pH 8), 150 mM NaCl and 1% glycerol. Unless stated differently, all experiments were performed at 20 °C. k_{cat} values were determined by following the release of tritium from the [5-³H]dUMP stock (Moravek), as described in [3], under aerobic and anaerobic (as below) conditions.

Spectroscopy

Most equilibrium and stopped-flow spectroscopic experiments were performed under anaerobic conditions. To achieve this, all solutions were prepared in vials that were sealed with gastight stoppers and degassed by several cycles of vacuum pumping and equilibration with argon. During this stage, the solutions contained glucose oxidase from *Aspergillus niger* and catalase from the cow liver, at a concentration of 0.3 units/μl. Glucose solutions were degassed separately and added with a gastight syringe to the reaction solutions to a final concentration of 10 mM, completing the glucose oxidase/catalase/glucose oxygen scavenger cocktail. Equilibrium absorption spectra were taken in gastight 1 mm optical path length cells using a Shimadzu

UV–Vis 1700 spectrometer. Equilibrium dUMP titration spectra were corrected for scattering by baseline subtraction. Stopped-flow transient spectrally-resolved absorption experiments were performed using a Biologic SFM 300 instrument equipped with a J&M Tidas diode array detector. The optical path length of the measuring cell was 0.8 mm. The dead time of the instrument was ~1 ms and spectra were recorded every 0.8 ms. For the experiments under anaerobic conditions, the instrument was extensively flushed with gaseous nitrogen before use. For the stopped-flow experiments, after mixing the final concentration of flavin-containing active sites was ~50 μM. For the MTHF (5,10-methylenetetrahydrofolate) mixing experiments, the intensity of the measuring light was lowered to avoid light-induced effects on the timescale of the measurements; therefore, the S/N (signal/noise) ratio was somewhat lower for these experiments.

Spectroelectrochemistry

UV–visible mediated spectroelectrochemical titration of ThyX was performed in solution using a home-made bulk electrolysis cell described previously [15]. The working electrode was a gold grid, the auxiliary electrode was a platinum wire and the reference electrode was a DRIFEF-2 Ag/AgCl/KCl 3M [World Precision Instruments; $E^\circ = 0.20$ V compared against a NHE (normal hydrogen electrode); 20 °C]. All potentials are given compared against the NHE. The electrochemical cell was maintained under argon pressure during the entire experiment and anaerobicity of the cell was verified by checking the stability of the reduced enzyme in the absence of an applied potential over a few minutes. Spectral changes were monitored at 449 nm on a SPECORD S600 diode-array spectrometer (Analytik Jena). After each potential step, the solution was left to equilibrate until two identical UV–visible spectra were recorded.

Redox titrations were conducted on 1.5 ml of a protein sample containing 12.5 μM of FAD cofactor in 30 mM Hepes and 300 mM NaCl buffer at pH 8. For the experiment conducted in the presence of the dUMP, 2 mM dUMP was added to the solution. The redox titrations were performed in the presence of equimolar amounts (with respect to the FAD cofactor) of each of the following mediators: hexaamineruthenium, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, anthraquinone-2-sulfonate and Methyl Viologen. The data were analysed using the Nernst equation for a single redox process: fraction of oxidized FAD = $(\exp[(E_{app} - E^\circ)nF/RT + 1]^{-1})^{-1}$, where n is the number of electrons, E_{app} is the applied potential and E° is the apparent standard potential of interest ($F = 96500$ C/mol and $R = 8.31$ J · mol⁻¹ · K⁻¹). n values ranging from 1.8 to 1.95 *a posteriori* validated the hypothesis of a single two-electron redox process FAD1 FADH₂.

RESULTS

With the exception of the data presented in Figure 3(C), all experiments were performed under anaerobic conditions (see the Materials and methods section). This allows monitoring kinetics under single-turnover conditions.

Kinetics of dUMP binding to oxidized ThyX

Using spectroscopy at equilibrium we observed that binding of dUMP to the oxidized ThyX enzyme leads to substantial changes in the flavin absorption spectrum, including significant red shifts of the peaks at 370 and 450 nm (Figure 1A). Note that dUMP itself does not absorb in this spectral range. This finding is in agreement

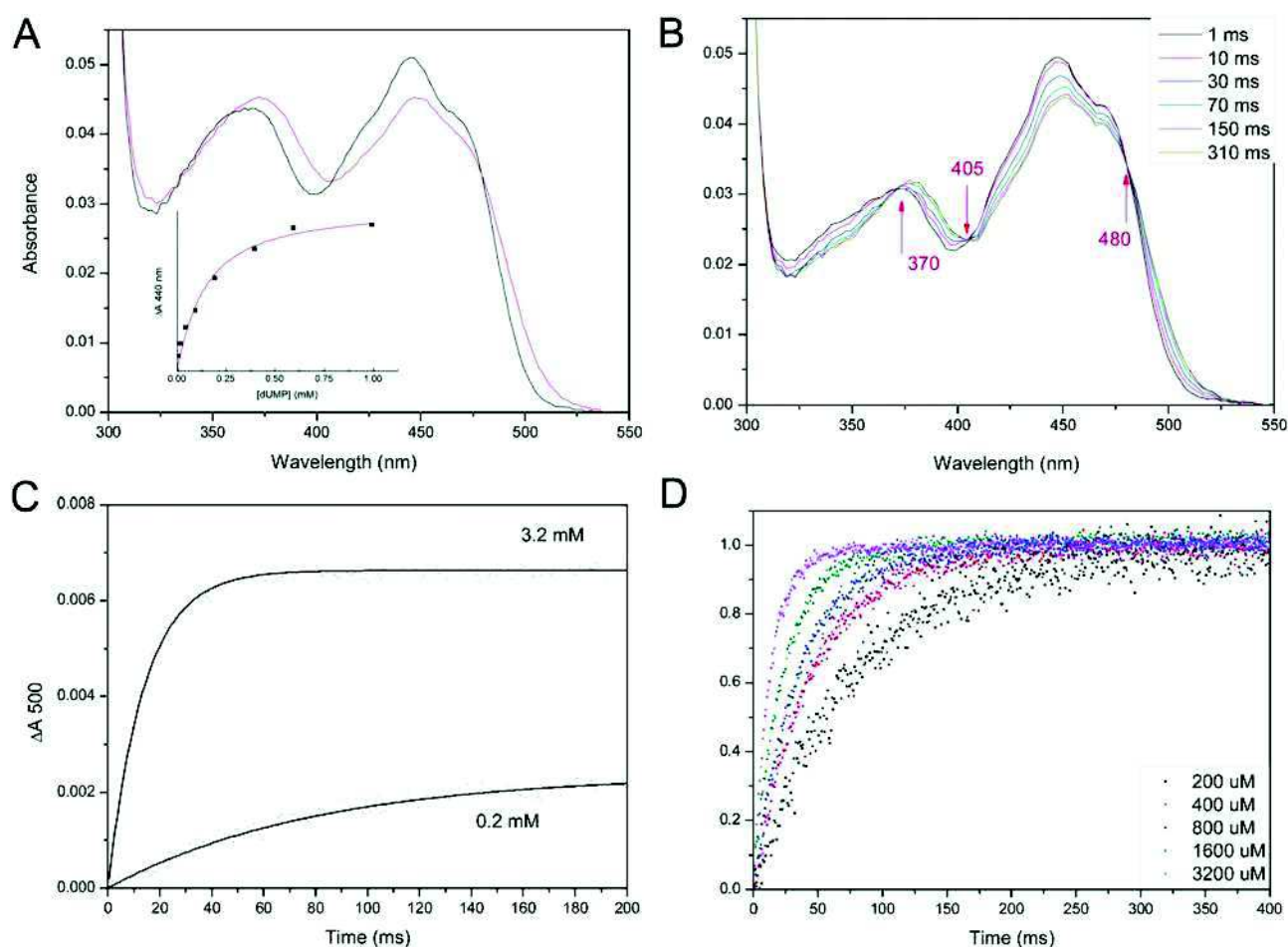


Figure 1 dUMP binding to ThyX in the absence of NADPH

(A) Equilibrium absorption spectra of ThyX in the absence (black) and presence (red) of 0.5 mM dUMP. Inset: titration of the amplitude of the spectral change at 440 nm as a function of [dUMP]. The fit to the tight binding formalism [37] yields a K_d value of 0.12 ± 0.02 mM. (B) Spectra at selected times after mixing ThyX (final flavin concentration $\sim 50 \mu\text{M}$) with dUMP (final concentration 0.4 mM), showing the red shift of both maxima of the FAD spectrum upon dUMP binding. The arrows indicate the three isosbestic points. (C) Kinetics of absorption changes at 500 nm at final dUMP concentrations of 0.2 and 3.2 mM. The lines are fits to single exponential rises. (D) Normalized 500-nm kinetics.

with X-ray crystallographic studies of the *T. maritima* enzyme [16] that dUMP binds in close proximity to flavin, and with observations of dUMP-induced spectral changes in the oxidized form of that enzyme [17]. Titration of dUMP allows determining an apparent K_d value of 0.12 ± 0.02 mM (Figure 1A, insert). We note that this relatively high value may reflect the possibility that dUMP also efficiently binds to active sites not containing flavin.

We exploited this spectral change to study the binding kinetics of dUMP. Figure 1(B) shows an example of the spectral changes observed on the millisecond timescale. Three clear isosbestic points are also observed at 370, 405 and 480 nm, implying that no intermediate forms of the flavin–dUMP complex are populated. Accordingly, the kinetics could be uniformly described well by single exponential functions.

Figure 1(C) shows that both the kinetics and the amplitude (compare with Figure 1A, insert) of the spectral changes depend on the dUMP concentration in the millimolar range. The rate varies linearly with [dUMP] (Figure 1D) and a bimolecular binding constant (k_{on}) of $(19 \pm 1) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ was determined (Figure 2). The off rate (k_{off}) was determined from the intercept as $11 \pm 2 \text{ s}^{-1}$. Hence the affinity (K_d) for dUMP in the absence of other substrates is 0.58 ± 0.11 mM. This value is of the same order of magnitude as the apparent K_d value determined from

the amplitudes of the final dUMP-binding induced absorption changes, 0.12 ± 0.02 mM (Figure 1A, insert). The difference between the two values may be due to minor relaxation processes not giving rise to strong spectral changes, although it cannot be excluded that it is also related to a minor extend to the more extensive [dUMP] range used in the kinetic experiments.

Kinetics of single-turnover reduction of FAD by NADPH

In the absence of other substrates, reduction of FAD to FADH₂ by NADPH occurs on the timescale of minutes and is incomplete (Figure 3B, insert). This extremely low NADPH oxidation activity is consistent with previous measurements under aerobic multiple-turnover conditions [3]. In the presence of dUMP before mixing with NADPH, the reduction rate decreases drastically as is shown in Figure 3. The FAD absorption in the visible range is seen to disappear on the millisecond time range concomitant with a decrease in the NADPH absorption that has a maximum at 340 nm (Figure 3A), close to the FAD/FADH₂ isosbestic point [2]. The kinetics at all wavelengths >315 nm can be fit with two main components with time constants of ~ 25 ms and ~ 250 ms (rates of 40 s^{-1} and 4 s^{-1}). Although both phases have the same sign, the amplitude ratio varies somewhat over the spectrum. At the

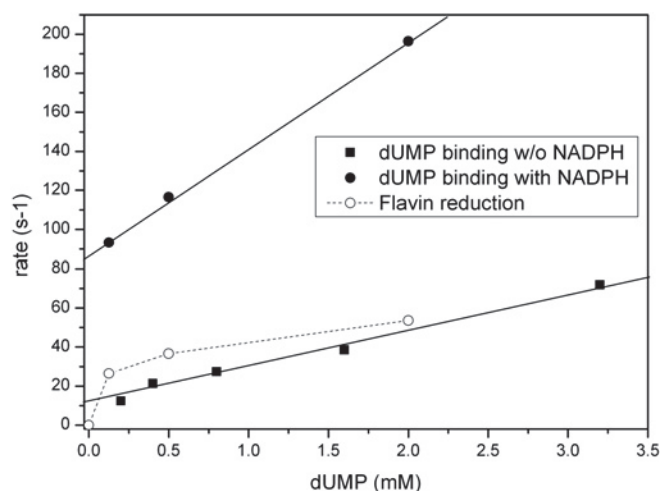


Figure 2 Rates of dUMP binding in the absence (data from Figure 1) and presence (data from Figure 3) of NADPH, as well as FAD reduction by NADPH (data of Figure 4) as a function of dUMP concentration

The slopes of the solid lines correspond to bimolecular rates of 19×10^3 and 54×10^3 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ in the absence and presence of NADPH respectively.

450-nm maximum of the FAD band the relative amplitude of the fast phase is $\sim 35\%$, whereas at the extreme red side the fast phase dominates the decay (Figure 3B). At 505 nm the fast phase represents 75% of the decay. The origin of this heterogeneity will be discussed in the Discussion section.

Within the investigated NADPH concentration range (0.3–3 mM) we observed no significant difference in the flavin reduction dynamics (Figure 3B). This implies that the observed dynamics reflect intrinsic reduction kinetics within the NADPH-bound ThyX–dUMP complex. The rate of NADPH binding is thus higher than $40 s^{-1}$ at a NADPH concentration of 0.3 mM, implying that the bimolecular NADPH binding constant is greater than $0.13 \times 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$.

For comparison, similar experiments were performed under aerobic conditions (Figure 3C), with air-equilibrated reactants ($\sim 280 \mu M O_2$). Even in the presence of large excess of O_2 , $FADH_2$ is formed near-stoichiometrically with initial NADPH oxidation, with kinetics (rates of $10\text{--}40 s^{-1}$, somewhat decreasing with $[NADPH]$ at concentrations <0.3 mM) on the same timescale as in the absence of O_2 . Under single-turnover conditions, $FADH_2$ re-oxidation by O_2 occurs with a time constant of ~ 0.7 s, substantially slower than its reduction. Consistently, under multiple-turnover conditions, $FADH_2$ is maintained for seconds if sufficient NADPH is present (and much longer when the NADPH concentration exceeds the O_2 concentration), and the rate of NADPH oxidation after the first fast phase is $\sim 1.5 s^{-1}$ per flavin.

Kinetics of dUMP binding and flavin reduction in NADPH-bound ThyX

As detailed above, the reduction of flavin by NADPH is accelerated strongly by dUMP, suggesting simultaneous interactions of the flavin cofactor with both substrates. This is in agreement with previous studies under equilibrium conditions indicating the formation of a sequential dUMP–NADPH–ThyX complex during ThyX catalysis [3,11]. We therefore set out to investigate the influence of the presence of NADPH on the binding of dUMP. To minimize flavin reduction by NADPH before dUMP

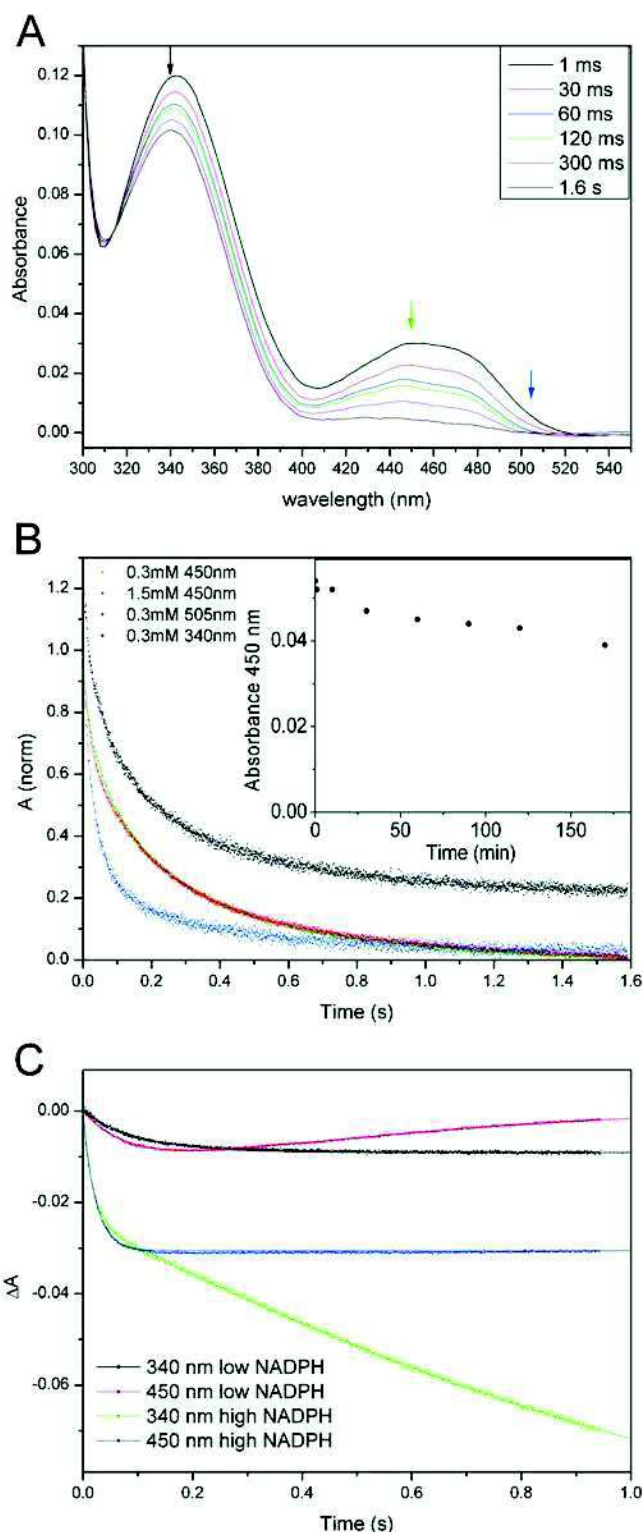


Figure 3 Kinetics of the reduction of ThyX (final flavin concentration $\sim 50 \mu M$) by NADPH in the presence of dUMP (450 μM final concentration)

(A) Anaerobic conditions. Spectra at selected times after mixing with NADPH (final concentration 0.3 mM). (B) Normalized kinetics of flavin reduction monitored at 450 nm (red) and 505 nm (blue) and NADPH oxidation at 340 nm (black, vertically offset for clarity), corresponding to the arrows in (A). The 450-nm kinetics at a final 1.5 mM NADPH concentration (green) are overlaid and virtually identical. Insert: kinetics of flavin reduction by NADPH (final concentration 0.5 mM) in the absence of dUMP. Note the different time scales. (C) Air-equilibrated conditions. Upper traces: single-turnover conditions ($[NADPH]/[FAD] 0.3$). Lower traces: multiple-turnover conditions ($[NADPH]/[FAD] 6$). Solid lines are fits. Traces are shifted to the same initial level.

binding, in these experiments ThyX and NADPH were mixed just before adding dUMP in the stopped-flow apparatus. Figure 4(A) shows an example of the spectral evolution under these conditions. The red shift of the flavin band reflecting dUMP binding is seen to occur within a few milliseconds; this spectral phase is immediately followed by the disappearance of the FAD band by reduction by NADPH. The overall process is essentially completed within ~ 100 ms, which is much faster than flavin reduction when the binding order of dUMP and NADPH are inverted (Figure 3 and Figure 4C,).

Figure 4(B) shows the kinetics at 506 nm that highlights the appearance of the red shift and the subsequent disappearance of flavin absorption, whereas Figure 4(C) follows absorption changes at 480 nm (isosbestic point for dUMP binding) essentially reflecting flavin reduction. These experiments were performed at different dUMP concentrations. After ~ 50 ms, the kinetics at 480 nm are similar to the decay at 506 nm, confirming that the time constant of the decay at 506 nm reflects flavin reduction and that of the rise at 506 nm dUMP binding. Equilibration with dUMP occurs significantly faster than in the absence of NADPH. This is due to both faster on and off rates. From the fitted rate constants as a function of [dUMP] we deduce a k_{on} value of $(54 \pm 2) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and a k_{off} value of 88 ± 2

s^{-1} . This finding indicates that NADPH can bind to ThyX in the absence of dUMP and that this binding facilitates both the binding and non-productive dissociation of dUMP. Thus NADPH binding appears to create or open up an exchange channel for dUMP with the environment. Our conclusion that ThyX accommodates NADPH in the absence of dUMP is supported by microcalorimetric NADPH titrations (Supplementary Figure S1 at <http://www.biochemj.org/bj/459/bj459ppppadd.htm>).

The absorption at 480 nm (isosbestic for dUMP binding) (Figure 4C) reflects the presence of oxidized FAD. The initial lag phase in the decay can be ascribed to dUMP binding, required for flavin to be efficiently reduced by NADPH. The subsequent decay kinetics are almost single exponential, with $>90\%$ of the decay occurring with a rate in the order of 30 s^{-1} . This rate is similar to that of the fastest phase of flavin reduction when dUMP is bound first (Figure 4C,), but the dominant slower ($\sim 4 \text{ s}^{-1}$) phase is strongly diminished. This indicates that NADPH stabilizes the flavin in a configuration favourable for its reduction once dUMP is bound. This stabilization occurs in ~ 250 ms. The flavin reduction kinetics also modestly depend on the dUMP concentration (Figures 2 and 4C). This finding may reflect an effect of dUMP binding to non-flavin-containing active sites (see the Experimental section) on those that contain a flavin cofactor.

dUMP binding does not modulate the redox potential of ThyX

To investigate the possibility that modification of the flavin apparent standard potential by dUMP is responsible for the drastic change in FAD reduction yield and rate by NADPH, we performed redox titrations of the PBCV-1 ThyX protein. Figure 5 shows that the titration curves are identical within experimental error in the absence and presence of near-saturating (2 mM) concentrations of dUMP, both with a $E^{\circ'}_{(\text{FAD}/\text{FADH}_2)}$ of ~ -275 mV compared with the NHE at pH 8.0. We conclude that the dUMP-induced gating of the reduction of FAD by NADPH is not due to modulation of the redox potential of the FAD/FADH₂ couple in the presence of dUMP.

The potential value obtained is quite similar to the one reported for the FMN/FMNH₂ redox couple in solution [18] (approximately 240 mV at pH 8.0), which indicates that the protein environment, as dUMP, has only a minor influence on

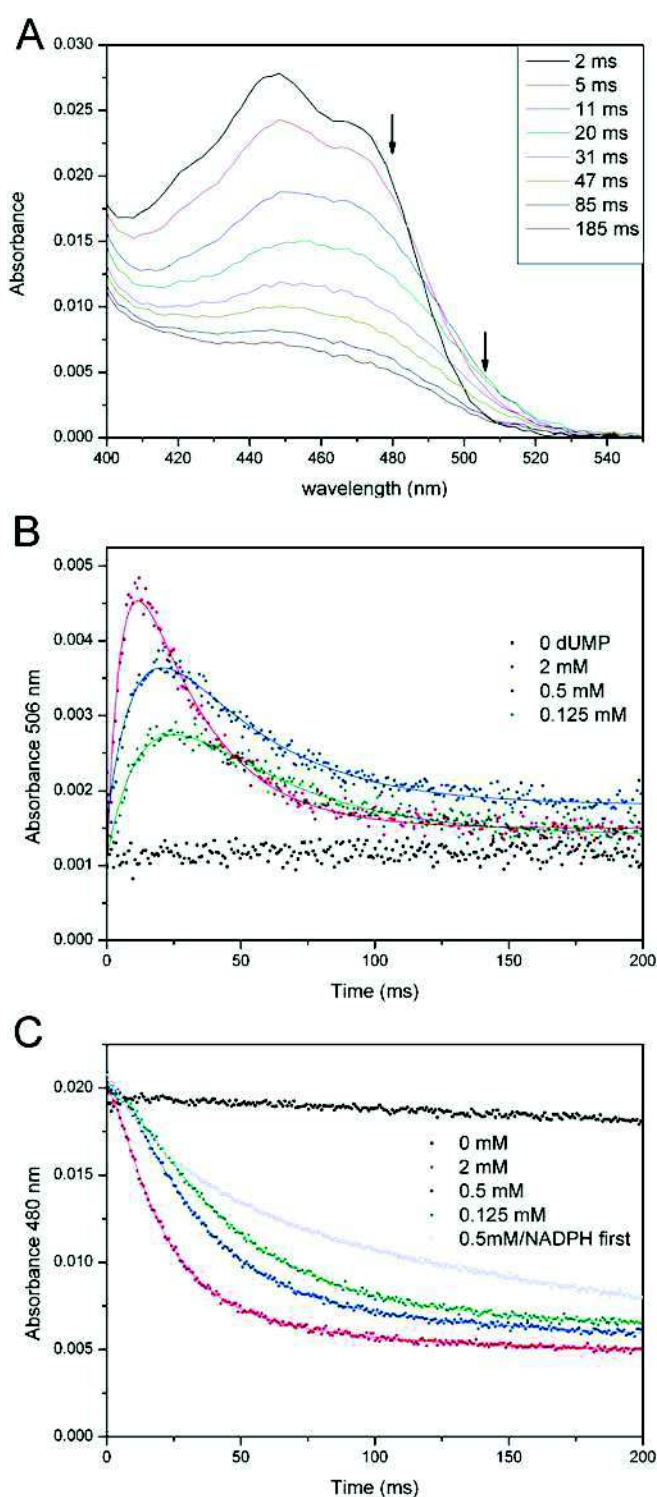


Figure 4 Kinetics of dUMP binding and flavin reduction in the presence of NADPH, as determined from double-mixing experiments

ThyX was mixed with NADPH and after a waiting time of 2 s mixed with dUMP. (A) Spectra at selected times after mixing the ThyX/NADPH mixture (final NADPH concentration 0.5 mM) with dUMP (final concentration 2 mM). The arrows indicate the wavelength of which the kinetics are shown in (B) (506 nm) and (C) (480 nm) at various dUMP concentrations. The blue open symbols in (C) correspond to the kinetics under the conditions of Figure 3 (NADPH mixed with the ThyX–dUMP complex), with a final dUMP concentration of 0.5 mM.

the redox properties of the flavin cofactor. We note that the FAD/FADH₂ apparent potential value in ThyX lies between those

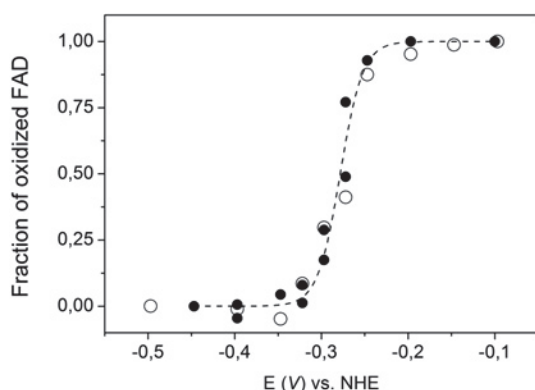


Figure 5 Fraction of oxidized ThyX determined from the absorbance variation monitored at 449 nm as a function of the applied potential

The redox titration was performed in the absence (○) and presence (●) of 2 mM dUMP. The line is the fitting of the Nernst equation to the experimental data obtained in the absence of dUMP ($E^{\circ'} = 279 \pm 10$ mV; $n = 1.95$). Similar values were obtained in the presence of dUMP ($E^{\circ'} = 275 \pm 10$ mV; $n = 1.8$).

of both physiological redox partners, i.e. the $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ redox couple ($E^{\circ'} = 354$ mV at pH 8.0) and the estimated $\text{CH}_2/\text{CH}_3\text{H}_4\text{folate}$ redox couple [19] ($E^{\circ'} \approx 200$ mV at pH 7.0) fully consistent with the catalytic role of the flavin as hydride transfer agent between NADPH and the methylene moiety.

Kinetics of MTHF binding and flavin re-oxidation

The ThyX reaction cycle is closed by adding MTHF to the reduced enzyme in the presence of dUMP. To investigate the kinetics of the MTHF binding and flavin re-oxidation process, the enzyme, as reduced by excess NADPH in the presence of dUMP, was mixed with MTHF. Figure 6 shows that with excess MTHF, the flavin was re-oxidized within the instrument dead time, ~ 1 ms. This implies that the intrinsic rate of flavin oxidation by MTHF is $>10^3$ s $^{-1}$. At a lower MTHF concentration, a fraction of the oxidation occurs with a rate of ~ 4 s $^{-1}$ and the amount of oxidized flavin after this phase depends on the MTHF concentration (Figure 6, insert). The first observation can be ascribed to MTHF binding to non-flavin-binding sites followed by migration to flavin-binding sites in ~ 250 ms. The second observation can be understood in terms of competition between MTHF and NADPH for the same site. Indeed, re-oxidized flavin can be reduced in a following cycle by NADPH and dUMP provided that NADPH can bind competitively to the flavin.

Catalysis

k_{cat} values were measured under aerobic and under anaerobic conditions and found to be 0.28 s $^{-1}$, in excellent agreement with previous work [3], and 0.55 s $^{-1}$ respectively. These results are in agreement with the notion that the flavin redox chemistry of the ThyX proteins occurs substantially faster than the ensemble of chemical reactions required for dTMP synthesis.

DISCUSSION

The *ménage à trois* of ThyX substrates is very complex. We have performed experiments that aimed at isolating and time-resolving individual reaction steps under single-turnover conditions and at establishing the interplay between the different substrates and the

flavin cofactor. We made use of the spectroscopic properties of the flavin, which not only monitor the redox states, but are also exquisitely sensitive to the environment. Our main experimental findings will be discussed in the framework of the reaction scheme of Figure 7.

The finding that the flavin spectrum shifts when only the dUMP substrate is present implies that dUMP binding in the active site does not require NADPH to be present, consistent with crystallographic observations of the *T. maritima* enzyme [16,20,21]. dUMP binding and dissociation in the absence of NADPH was found to occur with rather low rates [$(19 \pm 1) \times 10^3$ M $^{-1} \cdot$ s $^{-1}$ and 11 ± 2 s $^{-1}$ respectively] and an apparent K_d value as high as ~ 150 μM . The very low rate of flavin reduction by NADPH in the absence of dUMP in PBCV-1 ThyX is physiologically insignificant, but greatly facilitated the present study on the influence of NADPH on the dUMP-binding process. Both the k_{on} and the k_{off} values for dUMP binding increased substantially in the presence of NADPH. This finding has several implications. First, it suggests that NADPH can be accommodated by the protein in the absence of dUMP (Figure 7). This suggestion is supported by microcalorimetric NADPH-binding studies (Supplementary Figure S1). In the absence of dUMP, NADPH presumably does not bind in close contact with FAD, as (i) FAD reduction by hydride transfer from NADPH occurs at an extremely low rate and (ii) spectral changes of FAD are not observed upon the addition of NADPH (before flavin reduction). Secondly, it indicates that the presence of NADPH in ThyX facilitates substantially the exchange of dUMP between the active site and the environment.

The flavin reduction kinetics are heterogeneous when dUMP is bound first. A more red absorbing fraction of the flavins appears to be reduced faster by NADPH. As dUMP binding to oxidized ThyX leads to a red shift of the FAD spectrum, this finding suggests that the fraction that binds dUMP closest to the flavin cofactor is most efficiently reduced. This heterogeneity observed in real-time in the dUMP-binding mode is generally consistent with a high flexibility of FAD in the active site of ThyX proteins [17]. An alternative explanation of the spectral dependence of the kinetics could be the formation of an intermediate FAD–NADPH complex with a different spectral shape. We cannot fully exclude this possibility, but the observation that in the experiments of Figure 3 there is only one, coinciding (at 315 nm), isosbestic point for both kinetic phases (results not shown) indicates that FAD spectral heterogeneity is a more probable explanation. Also, analysis of the kinetics over the NADPH absorption band yields no indication for the formation of a red-shifted covalent NADPH adduct, recently reported as an intermediate in enzymatic hydride transfer [22]. We further note that apart from changes in the flavin and NADPH absorption bands, no indications for absorption bands at approximately >520 nm from charge-transfer transitions involving a formation of a FAD–NADP $^+$ complex are observed. This is different from what has been suggested previously for the *T. maritima* enzyme [8].

Although the flavin reduction kinetics are heterogeneous when dUMP is bound first, they are faster and almost monophasic when NADPH is allowed to enter the protein first. This finding also indicates that NADPH accommodates within the protein before dUMP binding. However, dUMP binding leads to repositioning of NADPH for efficient electron transfer to FAD to take place. Our redox titrations indicate that this is not due to modulation of the driving force of this reaction, as the redox potential of the FAD/FADH $_2$ couple are identical in the presence and absence of dUMP (Figure 5). Altogether, a complex picture of the interplay between NADPH and dUMP in the active site of ThyX emerges. Although dUMP itself does not participate in the

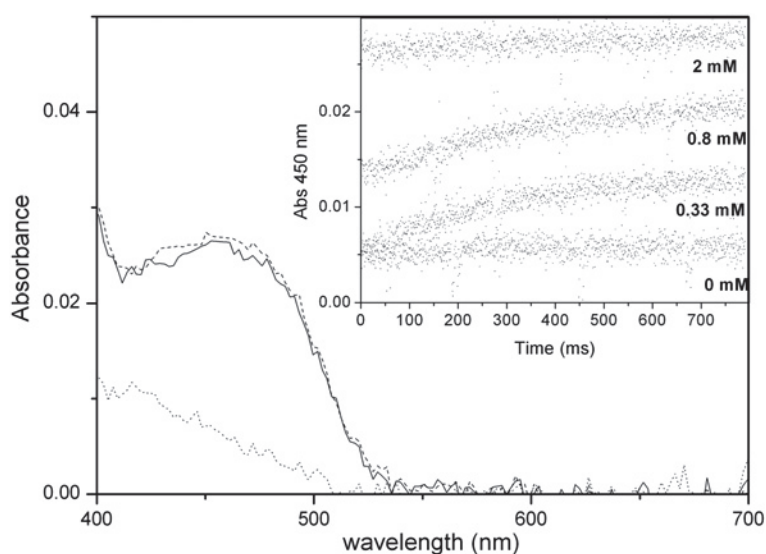


Figure 6 Flavin re-oxidation by MTHF

ThyX reduced by NADPH (final concentration 0.5 mM) in the presence of dUMP (final concentration 0.5 mM) was mixed with MTHF. Continuous and broken curves are spectra taken 1 ms and 500 ms respectively after mixing with MTHF (final concentration 2 mM). The dotted curve is obtained 1 ms after mixing with buffer. Insert: kinetics at 450 nm after mixing with MTHF to various final concentrations.

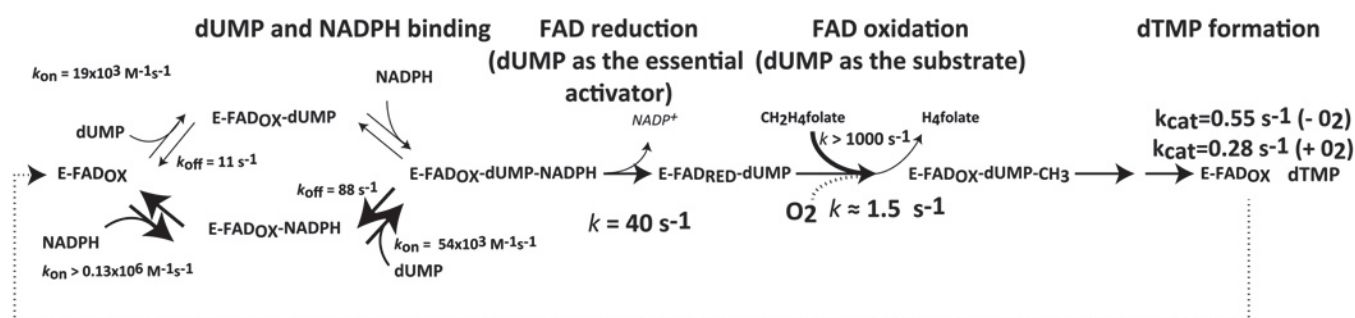


Figure 7 Proposed substrate binding and reaction scheme

chemistry of the reductive half reaction, it acts as an essential activator that positions the NADPH reductant with respect to the N5 atom of FAD and thereby activates ('gates') the reduction process. NADPH associates with the protein with a k_{on} value exceeding $0.13 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and then needs a few hundred milliseconds to be stabilized in the optimal position for reducing FAD, intrinsically at $\sim 30 \text{ s}^{-1}$ (provided dUMP is present). In reverse, NADPH opens an exchange pathway for dUMP, thus favouring rapid equilibration. In summary, our kinetic data reveal that, although, both NADPH and dUMP could *a priori* initiate the ThyX reaction cycle by binding to the oxidized active site, the reaction scheme where NADPH binding precedes that of dUMP is favoured kinetically (Figure 7, bold arrows).

Very recently, a high functional flexibility of the active site of the *T. maritima* ThyX enzyme was highlighted. Ultrafast spectroscopic experiments uncovered extremely high, and substrate-dependent, flexibility of the active site [17], that was interpreted in terms of a binding mechanism governed by very rapid conformational sampling (compare with [23]). Also, crystallographic studies identified important conformational changes associated with substrate binding [13]. The complex interplay between the substrates that we reveal in the present study is in general agreement with these studies.

It appears that the stacking interactions between the dUMP substrate and the isoalloxazine moiety of the flavin cofactor play a crucial role in positioning NADPH, thus accelerating the first step of the catalytic process. This finding is in general agreement with findings in other nucleotide-processing enzymatic reactions [24,25]; the specific additional feature in ThyX is that this stacking effect also promotes a reaction not involving the dUMP substrate itself.

The requirement for dUMP to be present to allow NADPH oxidation by FAD can be regarded as a mechanism to initiate enzymatic activity only if dUMP is available, thus limiting wasteful and potentially harmful turnover with molecular O₂. Indeed, the dUMP role as an essential activator limits the build-up of the intermediate FADH₂ state that is reactive with molecular O₂. In this context it is of interest to note that the rate of NADPH reduction in the absence of dUMP is much higher in ThyX from the anaerobic bacterium *T. maritima*, where this competing reaction does not play a role *in vivo* [7]. In this enzyme the activation by dUMP in the NADPH oxidase reaction is only ~ 5 -fold [7], whereas it is $>10^4$ for the reductive reaction in the PBCV-1 enzyme (Figure 3B). Strong inhibition of NADPH oxidation by flavin in the absence of aromatic substrates is a well-known protective mechanism in functional mono-oxygenases [26]. The

assessment of such a mechanism in ThyX, where O₂ is not a functional substrate, but where its presence cannot be avoided in aerobic organisms, strongly suggests that this mechanism actually functions in a wide variety of flavoenzymes.

We have also demonstrated that fully reduced FADH₂ is oxidized to the FAD form within 1 ms after the binding of CH₂H₄folate to the active site (Figure 6). As this reaction involves both CH₂H₄folate and dUMP [2] (flavin re-oxidation does not occur in the absence of dUMP), this indicates that the folate binding, rearrangement of the FAD–dUMP–CH₂H₄folate ternary complex and efficient hydride transfer from FADH₂ all occur within 1 ms. Our finding is consistent with a mechanism where flavin re-oxidation occurs before (or concerted with) methylene transfer, as proposed for *T. maritima* ThyX by Kohen et al. [5]. However it is inconsistent with that proposed by the same groups in a more recent paper [12] in which flavin oxidation was hypothesized to occur after transmethylation (itself thought to occur on the 100 ms-timescale).

Under aerobic conditions in the presence of dUMP, we observed an NADPH oxidase activity of 1.5 s⁻¹ for the PBCV-1 enzyme (Figure 3C), similar to that of the *T. maritima* enzyme [7]. This value corresponds to a rate of $\sim 5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, well above the reaction rate of O₂ with reduced flavin in solution [26,27] (250 M⁻¹ · s⁻¹), implying that ThyX also moderately catalyses the wasteful and peroxide-producing reaction of the dUMP-complexed FADH₂ with O₂. To compete with this reaction, fast re-oxidation of the flavin complex by the CH₂H₄folate substrate is therefore also relevant for organisms evolving in O₂-containing environments. Indeed, the >10³ s⁻¹ reaction rate assessed in the present study compares favourably with the NADPH oxidase activity of the order 10⁰ s⁻¹. Thus, whereas the absence of dUMP essentially blocks the formation of the FADH₂ complex (see above), NADPH oxidase activity only takes place when CH₂H₄folate is scarce. In actively dividing ThyX-containing bacteria this is not expected to be the case [28].

Our observations are analogous to MetF (methylenetetrahydrofolate reductase) that also catalyses the reduction of CH₂H₄folate by (NADH-reduced) FADH₂. In the initial characterization of this enzyme [29], the flavin oxidation reaction was reported to be much faster than the $\sim 30 \text{ s}^{-1}$ flavin reduction reaction (although the MetF reaction mechanism may be dependent on experimental conditions such as temperature and enzyme concentration) [30]. This situation is similar to the one we report in the present paper for ThyX. Therefore efficient and kinetically optimized folate reduction by FAD may be a general property for CH₂H₄folate-dependent enzymes and especially useful in aerobic environments.

In conclusion, we have dissected the early reaction steps of the ThyX reaction kinetics in a detailed manner. Our results have revealed that complex substrate–substrate and substrate–cofactor interactions position NADPH for optimal reactivity at the highly flexible [13,17] active site of this class of enzymes. The role of dUMP as an essential activator of NADPH oxidation activity and the rapidity of FADH₂ oxidation by CH₂H₄folate ensure efficient turnover of ThyX proteins even in the presence of molecular O₂. These observations therefore provide a mechanistic explanation for the unexpected presence of ThyX proteins in a large number of facultative or strict aerobic micro-organisms. Our data has also revealed that substrate binding and the redox chemistry of ThyX proteins does not limit overall ThyX catalysis, and underlines the fact that further characterization of rate-limiting reaction steps and/or chemical intermediates of ThyX catalysis should help in understanding the limits of prokaryotic genome evolution [12]. As ThyX proteins are a very promising antimicrobial target [31,32] and ThyX inhibitors are currently actively being identified [31,33–

35], the characterization of the dynamics of transient substrate interactions has also provided valuable information that may help in fighting against the increasing problem of antimicrobial resistance [36].

AUTHOR CONTRIBUTION

FUNDING

This work was supported by the Agence National de la Recherche [grant number ANR-09-PIRI-0019].

REFERENCES

- 1 Myllykallio, H., Skouloubris, S., Grosjean, H. and Liebl, U. (2009) Folate dependent thymidylate forming enzymes: parallels between DNA and RNA metabolic enzymes and evolutionary implications. In *DNA and RNA Modification Enzymes: Structure, Mechanism, Function and Evolution* (Grosjean, H., ed.), Landes Bioscience, Austin
- 2 Gattis, S. G. and Palfey, B. A. (2004) Direct observation of the participation of flavin in product formation by thyX-encoded thymidylate synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 832–833
- 3 Graziani, S., Xia, Y., Gurnon, J. R., Van Etten, J. L., Leduc, D., Skouloubris, S., Myllykallio, H. and Liebl, U. (2004) Functional analysis of FAD-dependent thymidylate synthase ThyX from *Paramecium bursaria* Chlorella virus-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 54340–54347
- 4 Griffin, J., Roshick, C., Iliffe-Lee, E. and McClarty, G. (2005) Catalytic mechanism of *Chlamydia trachomatis* flavin-dependent thymidylate synthase. *J. Biol. Chem.* **280**, 5456–5467
- 5 Koehn, E. M., Fleischmann, T., Conrad, J. A., Palfey, B. A., Lesley, S. A., Mathews, I. I. and Kohen, A. (2009) An unusual mechanism of thymidylate biosynthesis in organisms containing the thyX gene. *Nature* **458**, 919–923
- 6 Mattevi, A. (2006) To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 276–283
- 7 Chernyshev, A., Fleischmann, T., Koehn, E. M., Lesley, S. A. and Kohen, A. (2007) The relationships between oxidase and synthase activities of flavin dependent thymidylate synthase (FDTs). *Chem. Comm.* **27**, 2861–2863
- 8 Wang, Z., Chernyshev, A., Koehn, E. M., Manuel, T. D., Lesley, S. A. and Kohen, A. (2009) Oxidase activity of a flavin-dependent thymidylate synthase. *FEBS J.* **276**, 2801–2810
- 9 Giladi, M., Bitan-Banin, G., Mevarech, M. and Ortenberg, R. (2002) Genetic evidence for a novel thymidylate synthase in the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* and in *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol. Lett.* **216**, 105–109
- 10 Agrawal, N., Lesley, S. A., Kuhn, P. and Kohen, A. (2004) Mechanistic studies of a flavin-dependent thymidylate synthase. *Biochemistry* **43**, 10295–10301
- 11 Graziani, S., Bernauer, J., Skouloubris, S., Graille, M., Zhou, C. Z., Marchand, C., Decottignies, P., van Tilbeurgh, H., Myllykallio, H. and Liebl, U. (2006) Catalytic mechanism and structure of viral flavin-dependent thymidylate synthase ThyX. *J. Biol. Chem.* **281**, 24048–24057
- 12 Mishanina, T. V., Koehn, E. M., Conrad, J. A., Palfey, B. A., Lesley, S. A. and Kohen, A. (2012) Trapping of an intermediate in the reaction catalyzed by flavin-dependent thymidylate synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4442–4448
- 13 Mathews, I. I. (2013) Flavin-dependent thymidylate synthase as a drug target for deadly microbes: mutational study and a strategy for inhibitor design. *J. Bioterr. Biodef.* **S12**, 004
- 14 Escartin, F., Skouloubris, S., Liebl, U. and Myllykallio, H. (2008) Flavin dependent thymidylate synthase X limits chromosomal DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 9948–9952
- 15 Balland, V., Hureau, C., Cusano, A. M., Liu, Y., Tron, T. and Limoges, B. (2008) Oriented immobilization of a fully active monolayer of histidine-tagged recombinant laccase on modified gold electrodes. *Chemistry* **14**, 7186–7192
- 16 Mathews, I. I., Deacon, A. M., Canaves, J. M., McMullan, D., Lesley, S. A., Agarwalla, S. and Kuhn, P. (2003) Functional analysis of substrate and cofactor complex structures of a thymidylate synthase-complementing protein. *Structure* **11**, 677–690
- 17 Laptanok, S. P., Bouzahir-Sima, L., Lambry, J.-C., Myllykallio, H., Liebl, U. and Vos, M. H. (2013) Ultrafast real time visualization of the active site flexibility of the flavoenzyme thymidylate synthase ThyX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 8924–8929

- 18 Mayhew, S. G. (1999) The effects of pH and semiquinone formation on the oxidation-reduction potentials of flavin mononucleotide. *Eur. J. Biochem.* **265**, 698–702
- 19 Maden, B. E. H. (2000) Tetrahydrofolate and tetrahydromethanopterin compared: functionally distinct carriers in C₁ metabolism. *Biochem. J.* **350**, 609–629
- 20 Sampathkumar, P., Turley, S., Ulmer, J. E., Rhie, H. G., Sibley, C. H. and Hol, W. G. J. (2005) Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* flavin dependent thymidylate synthase (MtbThyX) at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **352**, 1091–1104
- 21 Zhang, X., Zhang, J., Guo, G., Mao, X., Hu, Y. and Zou, Q. (2012) Crystal structure of a flavin-dependent thymidylate synthase from *Helicobacter pylori* strain 26695. *Protein Pept. Lett.* **19**, 1225–1130
- 22 Rosenthal, R. G., Ebert, M.-O., Kiefer, P., Peter, D. M., Vorholt, J. A. and Erb, T. J. (2014) Direct evidence for a covalent ene adduct intermediate in NAD(P)H-dependent enzymes. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 50–55
- 23 Vogt, A. D. and Di Cera, E. (2013) Conformational selection is a dominant mechanism of ligand binding. *Biochemistry*, **52**, 5723–5729
- 24 Kaukinen, U., Lonnberg, H. and Perakyla, M. (2004) Stabilisation of the transition state of phosphodiester bond cleavage within linear single-stranded oligoribonucleotides. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 66–73
- 25 Pecci, I., Leveles, I., Harmat, V., Vertessy, B. G. and Toth, J. (2010) Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dUTPase. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7179–7186
- 26 Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 22459–22462
- 27 Massey, V., Palmer, G. and Ballou, D. P. (1973) *Oxidases and Related Systems*. (King, T., Mason, H. and Morrison, M., eds), pp. 25–43, University Park Press, Baltimore
- 28 Leduc, D., Escartin, F., Nijhout, H. F., Reed, M. C., Liebl, U., Skouloubris, S. and Myllykallio, H. (2007) Flavin-dependent thymidylate synthase ThyX activity: implications for the folate cycle in bacteria. *J. Bacteriol.* **189**, 8537–8545
- 29 Sheppard, C. A., Trimmer, E. E. and Matthews, R. G. (1999) Purification and properties of NADH-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MetF) from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**, 718–725
- 30 Trimmer, E. E., Ballou, D. P. and Matthews, R. G. (2001) Methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*: elucidation of the kinetic mechanism by steady-state and rapid-reaction Studies. *Biochemistry* **40**, 6205–6215
- 31 Basta, T., Boum, Y., Briffotiaux, J., Becker, H., Lamarre-Jouenne, I., Lambry, J.-C., Skouloubris, S., Liebl, U., Graille, M., van Tilbeurgh, H. and Myllykallio, H. (2012) Mechanistic and structural basis for inhibition of thymidylate synthase ThyX. *Open Biol.* **2**, 2046–2441
- 32 Myllykallio, H., Lipowski, G., Leduc, D., Filee, J., Forterre, P. and Liebl, U. (2002) An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis. *Science* **297**, 105–107
- 33 Kögler, M., Vanderhoydonck, B., De Jonghe, S., Rozenski, J., Van Belle, K., Herman, J., Louat, T., Parchina, A., Sibley, C., Lescrinier, E. and Herdewijn, P. (2011) Synthesis and evaluation of 5-substituted 2'-deoxyuridine monophosphate analogues as inhibitors of flavin-dependent thymidylate synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* **54**, 4847–4862
- 34 Önen, F. E., Boum, Y., Jacquement, C., Spanedda, M. V., Jaber, N., Scherman, D., Myllykallio, H. and Herscovici, J. (2008) Design, synthesis and evaluation of potent thymidylate synthase X inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 3628–3631
- 35 Parchina, A., Froeyen, M., Margamuljana, L., Rozenski, J., De Jonghe, S., Briers, Y., Lavigne, R., Herdewijn, P. and Lescrinier, E. (2013) Discovery of an acyclic nucleoside phosphonate that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* ThyX based on the binding mode of a 5-alkynyl substrate analogue. *ChemMedChem* **8**, 1373–1383
- 36 Copeland, R. (2005) *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. Wiley, Hoboken
- 37 Copeland, R. (2004) *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. John Wiley & Sons, New York

SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

Substrate interaction dynamics and oxygen control in the active site of thymidylate synthase ThyX

Hubert F. BECKER*†‡, Kamel DJAOUT*†, Isabelle LAMARRE*†, Jonathan E. ULMER*†, Delphine SCHAMING§, Véronique BALLAND§, Ursula LIEBL*†, Hannu MYLLYKALLIO*† and Marten H. VOS*†¹

*Laboratory for Optics and Biosciences, CNRS Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau, France

†INSERM U696, 91128 Palaiseau, France

‡UPMC Univ Paris 06, 75005 Paris, France

§Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire, UMR CNRS 7591, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 15, rue Jean-Antoine de Baïf, 75205 Paris Cedex 13, France

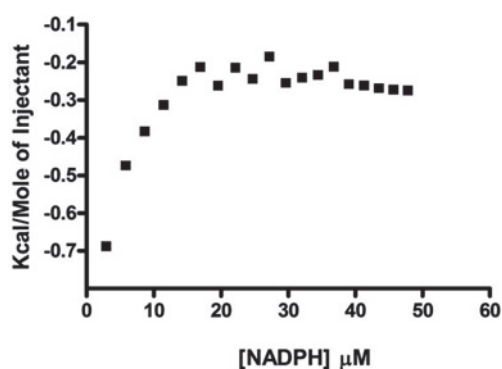


Figure S1 Microcalorimetric titration of NADPH binding to PBCV-1 ThyX under conditions where no FAD reduction occurs (absence of dUMP; see the insert of Figure 3B of main text)

Experiments were performed at 30 °C in 30 mM Hepes (pH 8) and 300 mM NaCl, using a GE Healthcare ITC200 microcalorimeter. The tetramer concentration ThyX was 5 µM. The initial volume was 200 µl and 2 µl injections of 300 µM NADPH, spaced at 180 s, were made. The plot shows the integrated peak area of the individual injections, corresponding to enthalpic changes due to NADPH binding to the protein. These data show that, in the absence of dUMP, NADPH binding to ThyX saturates in the low micromolar concentration range.

Received 2 December 2013/10 January 2014; accepted 15 January 2014

Published as BJ Immediate Publication 15 January 2014, doi:10.1042/BJ20131567

¹ To whom correspondence should be addressed (email marten.vos@polytechnique.edu).

J'ai participé au travail réalisé sur ThyX *PBCV-1*, plus particulièrement, au contrôle de l'O₂ et de la réaction non physiologique qui le met en jeu. C'est ce travail qui est détaillé ici :

Nous désirions mesurer la vitesse d'oxydation du FADH₂ par l'O₂ par spectroscopie résolue en temps. Afin de s'affranchir des difficultés de contrôle des concentrations d'O₂, nous avons réalisé ces expériences en conditions aérobies dans lesquelles, la concentration d'O₂ est de l'ordre de 280 μM en solution, à température ambiante et pression atmosphérique. Nous pouvons déjà noter que dans ces conditions, la concentration en O₂ est supérieure à sa concentration *in vivo*, car celle-ci décroît à température physiologique (37°C).

Comme expliqué plus loin, et afin d'être en conditions de turnover unique, nous avons employé des concentrations sous-stœchiométriques de NADPH par rapport à l'O₂. De cette manière, nous désirions n'observer qu'un évènement de réduction et d'oxydation de la flavine.

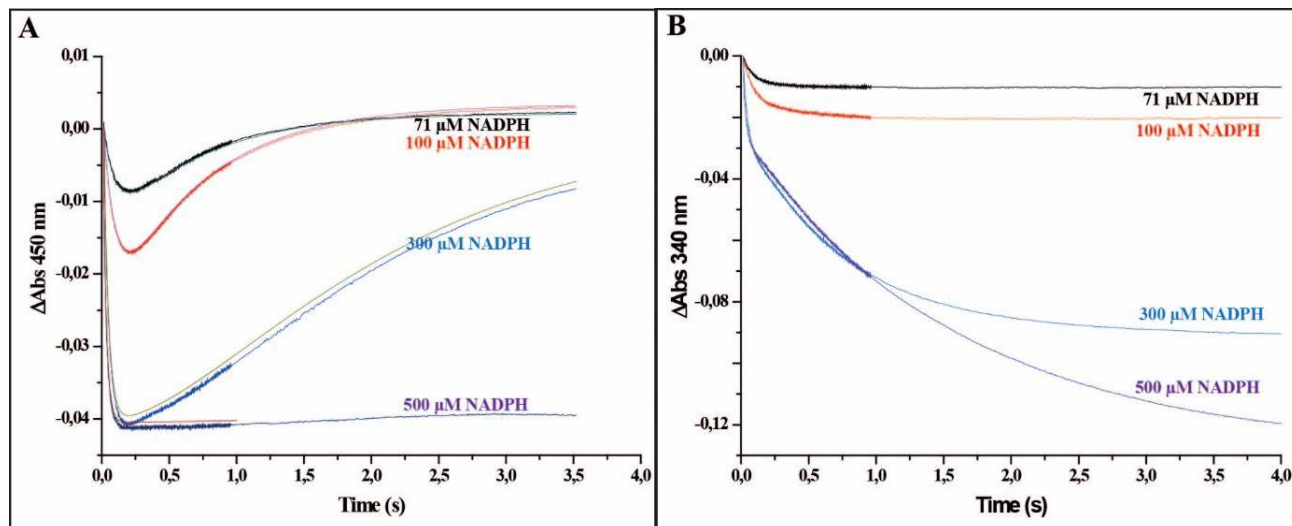
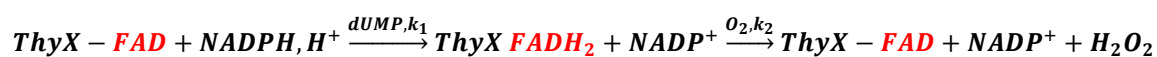


Figure 2-3 Réduction et réoxydation successives de *PBCV-1* ThyX-FAD par le NADPH et par O_2 respectivement. 50 μ M de ThyX-FAD *PBCV-1* (500 μ M de ThyX *PBCV-1*) pré-incubé avec du dUMP (500 μ M) est mélangé dans la cuve avec une concentration croissante de NADPH en conditions aérobies. Les spectres sont mesurés toutes les 0.8 ms pendant 1 s, puis moyennés sur 8 ms pendant 10 s. A) Cinétiques mesurées à 450 nm pour différentes concentrations de NADPH. Les tracés correspondent aux ajustements (voir texte). B) Cinétiques mesurées à 340 nm pour différentes concentration de NADPH. Les tracés correspondent aux ajustements (voir texte).

Nous étudions ici deux réactions successives :



et nous pouvons écrire :

$$\frac{d[\text{FAD}]}{dt} = -k_1[\text{FAD}] + k_2[\text{FADH}_2] \quad (1)$$

En sachant que :

$$[\text{FAD}] = [\text{FAD}]_0 - [\text{FADH}_2] \quad (2)$$

Nous montrons en annexe 3 que :

$$[FAD] = [FAD]_0 \left[1 - \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \right] \quad (3)$$

où $[FAD]_0$ est la concentration de FAD à $t = 0$, et $[FAD]$ est la concentration de FAD à l'instant t .

La cinétique est décrite par la somme de deux exponentielles dont nous cherchons à mesurer les constantes observées. Nous avons ajusté les cinétiques obtenues dans le programme Bio-kine à l'équation (4).

$$A = at + b + A_0 e^{-K_{obs1} t} + A_1 e^{-K_{obs2} t} \quad (4)$$

Où k_{obs1} et k_{obs2} correspondent à la vitesse observée de réduction et de ré-oxydation de la flavine respectivement, et le terme linéaire $at + b$ permet de corriger pour les évènements optiques qui ne correspondent pas à la réaction (photo réduction, diminution de la sensibilité du détecteur en fonction du temps, ...) et est calculé sur la partie linéaire des cinétiques, après la réaction. Ce terme linéaire se retrouve dans toutes mes analyses. Il est égal à zéro lorsque l'absorbance est stable en fonction du temps.

Nous observons dans la figure 2-3.A les cinétiques à 450 nm qui correspondent au signal des flavines. Lorsque le NADPH est en excès (500 μ M, Fig. 2-3, courbe violette), nous ne pouvons voir que la réduction de ThyX-FAD

en ThyX-FADH₂. Pour des concentrations de NADPH inférieures ou égales à celles de l'O₂, nous pouvons cependant observer les deux réactions successives (Fig. 2-3, NADPH 71, 100 et 300 μM). Les cinétiques à 340 nm, présentées dans la figure 2-3.B correspondent à l'oxydation couplée du NADPH.

La concentration en O₂ en solution est de 280 μM à pression atmosphérique et température ambiante. Par conséquent, à 71 et 100 μM de NADPH, nous pouvons voir la réduction puis réoxydation de la flavine en conditions de turn-over unique car, comme montré dans la figure 2-3, l'oxydation du NADPH ne se poursuit pas après réduction de la flavine (250 - 500 ms). La seconde phase observée à 450 nm (Fig. 2-3.A) correspond ainsi très majoritairement à la réoxydation du FADH₂ en FAD. Dans ces conditions, la vitesse apparente de réduction et de réoxydation de la flavine est de 10 s⁻¹ et de 1,5 s⁻¹ respectivement.

En augmentant la concentration en NADPH, nous pouvons voir d'une part, les vitesses apparentes d'oxydation du NADPH et de réduction du FAD augmenter (28 et 40 s⁻¹ pour 300 et 500 μM de NADPH, respectivement), et d'autre part la vitesse apparente de réoxydation du FADH₂ diminuer (0.8 s⁻¹ et non observable, respectivement). Dans ces conditions, nous n'observons plus une réaction unique, mais la résultante des deux réactions en compétition après la première réduction, comme montré par l'oxydation couplée du NADPH qui persiste pendant la phase de réoxydation des flavines (Fig. 2-3. A et B, 300 et

500 μM). Pendant cette seconde phase, le FADH_2 est ré-oxydé par O_2 , puis réduit à nouveau par le NADPH en solution. La résultante dépend de la concentration de NADPH et d' O_2 , ainsi que de la vitesse de chaque réaction.

De cette manière, nous avons pu estimer la vitesse de réoxydation du FADH_2 par l' O_2 en turnover unique dans ThyX *PBCV-1* à 1.5 s^{-1} .

2.5 Discussion

Nous nous sommes efforcés d'isoler les différentes étapes de la réaction individuellement, et de déterminer les interactions transitoires que forment les substrats avec le cofacteur FAD par spectroscopie résolue en temps. La même méthode nous a également permis d'aborder la réactivité de la flavine dans le site actif avec l'oxygène moléculaire (O_2).

D'une part, nous montrons que le dUMP et le NADPH peuvent tous deux se fixer à ThyX-FAD, la première étape de formation du complexe ThyX-FAD-dUMP-NADPH semble en ce sens désordonnée. Cependant, la fixation et de dissociation du dUMP se fait à des vitesses faibles en absence de NADPH, tandis que la fixation préalable du NADPH facilite l'entrée du dUMP au site actif. Nous en déduisons que la fixation du NADPH au site actif induit des changements conformationnels qui facilitent l'échange de dUMP entre le site actif et le milieu. L'ordre de fixation ($\text{NADPH} \rightarrow \text{dUMP}$) est favorisé.

Inversement, la réduction du FAD par le NADPH est très inefficace en absence de dUMP mais présente une vitesse de 40 s^{-1} en présence de dUMP. Pour cette première partie de la réaction (partie réductrice, Fig. 1-14), le dUMP joue le rôle d'activateur mais pas de substrat. Il semble que le dUMP repositionne le FAD et le NADPH afin que le transfert d'hydrure soit efficace. ThyX *PBCV-1* a donc besoin des deux substrats (dUMP et NADPH) afin de réaliser le premier transfert d'hydrure. Cela peut s'interpréter comme un mécanisme limitant l'accumulation de la forme FADH_2 .

L'enzyme réduite, ThyX- FADH_2 , peut réagir avec le dioxygène en solution. Cette réaction est généralement considérée comme non physiologique car elle produit du H_2O_2 , espèce très réactive qui peut s'avérer dangereuse *in vivo* [108]. *In vitro*, elle se traduit uniquement par la consommation de NADPH par l'enzyme sans consommation de dUMP. C'est l'activité NADPH oxydase de ThyX.

Le dioxygène et le $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$ sont en compétition pour l'enzyme sous forme ThyX- FADH_2 [110]. Mais nous montrons que la ré-oxydation du FADH_2 en FAD est plus rapide par l'ajout de $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$ ($>1000 \text{ s}^{-1}$) que par O_2 (1.5 s^{-1}) dans ThyX *PBCV-1*. Par ailleurs, une respiration active limite d'autant plus la biodisponibilité de l'oxygène dans les organismes aérobies [111]. Ces éléments privilégient tous la réaction de synthèse de dTMP par rapport à la réactivité avec l' O_2 .

Ces observations peuvent expliquer pourquoi des organismes aérobies peuvent également utiliser ThyX en tant que thymidylate synthase. La réaction « contaminante » faisant intervenir l'O₂ serait largement défavorisée dans la cellule, limitée par la concentration limitée en O₂ et par la compétition active du CH₂H₄folate pour l'enzyme réduite (ThyX-FADH₂).

3. Chapitre III – Cinétique du mécanisme de ThyX *Mtb*

3.1 Introduction

La structure quaternaires des ThyXs est globalement conservée à travers les espèces, et il est supposé que leurs mécanisme l'est également. Cependant, nous ne pouvons nous empêcher de constater les différences structurales entre les enzymes étudiées dans la littérature.

Sampathkumar et al [89] ont été les premiers à résoudre la structure de ThyX *Mtb*. En la comparant à la structure de ThyX *PBCV-1*, Graziani et al. ont mis en évidence plusieurs caractéristiques spécifiques de chaque protéine [93].

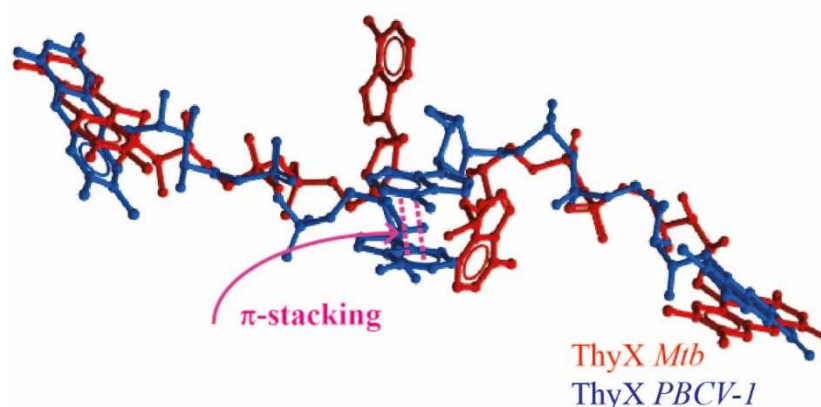


Figure 3-1 : Orientation de la flavine dans ThyX *Mtb* (rouge, PDB : 3HZG) et ThyX *PBCV-1* (bleu, PDB: 2CFA). L'empilement des adénines des FAD dans ThyX *PBCV-1* est montré par les pointillés en rose. Image réalisée avec MolSoft.

La fixation du cofacteur FAD est sensiblement différente entre ThyX *PBCV-1* et ThyX *Mtb* [93]. Les noyaux adénine des cofacteurs FAD dans ThyX *PBCV-1* s'empilent deux à deux, pris en sandwich entre deux histidines au cœur

de la protéine. Cela n'est pas observé dans ThyX *Mtb* dans laquelle les adénines des cofacteurs FAD n'interagissent pas du tout, et sont orientés différemment (Fig. 3-1).

Il est admis que dans une flavoprotéine, l'environnement de la flavine est en étroite relation avec sa réactivité. Les différences observées dans l'ancrage du FAD et les interactions qu'il établit avec la protéine peuvent influencer certains aspects du mécanisme de ThyX. Nous pouvons par exemple noter que ThyX *Mtb* a la constante catalytique la moins élevée (0.65 min^{-1} , [101]) tandis que ThyX *PBCV-1* a la plus élevée (33 min^{-1} , [90]), des ThyX citées à ce jour dans la littérature.

Mon objectif ici a été d'étudier la cinétique du mécanisme et la réactivité d'oxydo-réduction de ThyX *Mtb* afin d'expliquer les différences dans son efficacité catalytique, comparée à l'enzyme virale ThyX *PBCV-1*. Je me suis particulièrement intéressé au comportement de la flavine en fonction des différents réducteurs et oxydants que pourrait rencontrer ThyX *Mtb in vivo*. Les informations recueillies sur l'interaction du site actif avec les différents substrats au cours de la réaction peuvent être d'une grande importance dans le design rationnel d'inhibiteurs dirigés contre ThyX *Mtb* [112].

Dans cette optique, j'ai pu combiner des techniques biochimiques, enzymologiques et spectroscopiques afin d'étudier l'effet et les interactions des différents acteurs dans et avec le site actif. L'étude du mécanisme de ThyX *Mtb*

a donné des résultats surprenants en termes de spécificité de substrat de l'enzyme et leur ordre de fixation au cours de la partie réductrice et oxydative de la réaction. Ces observations démarquent ThyX *Mtb* des autres ThyX décrites à ce jour. Nous décrirons dans un premier temps les tests d'activité utilisés pour mesurer l'activité de ThyX, et dans un second temps, les résultats obtenus pour ThyX *Mtb*.

3.1.1 Les tests d'activité de ThyX

En plus des méthodes de spectroscopie, deux tests d'activité permettent de mesurer l'activité de ThyX *in vitro* : Le test d'oxydation du NADPH et le test de déprotonation.

Le test d'oxydation du NADPH est un test spectrophotométrique. Dans la première partie de la réaction, le NADPH transfère un hydrure au FAD en présence de dUMP. Cela produit du NADP⁺ et l'enzyme réduite ThyX-FADH₂. Le NADPH absorbe à 340 nm contrairement au NADP⁺. Par conséquent la mesure de l'absorbance à 340 nm en fonction du temps rend compte de l'activité d'oxydation du NADPH par ThyX *Mtb*. Ce test a été miniaturisé et est aujourd'hui mesuré dans des microplaques de 96 puits dans un lecteur de plaques Hidex Chameleon équipé d'un système de pompe/injecteur qui permet de démarrer la réaction de façon automatique par l'ajout de NADPH. L'oxydation du NADPH ne rend cependant pas compte de la synthèse de dTMP.

En effet, l'enzyme peut réagir avec le $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$ et l' O_2 et ces deux réactions induisent la consommation du NADPH.

Le test de déprotonation consiste à ajouter au mélange réactionnel une fraction de dUMP qui porte un tritium [H^3] sur le carbone 5 du noyau pyrimidique. Lorsque le dUMP est méthylé, le tritium est relâché dans le milieu. J'arrête les réactions par l'addition d'un mélange de charbon actif et d'acide trichloracétique. L'acide dénature les protéines assurant ainsi l'arrêt de la réaction, et le charbon actif fixera, entre autre, le dUMP qui n'aura pas réagi et qui reste présent dans le mix en fin de réaction. Après centrifugation, je ne récupère que le surnageant contenant l'eau tritiée, et nous supposons qu'un tritium libéré équivaut à une molécule de dTMP formée. C'est donc indirectement l'activité de synthèse du dTMP qui est mesurée dans ce cas.

3.2 Résultats

3.2.1 Expression et purification de ThyX *Mycobacterium tuberculosis*

J'ai exprimé ThyX *Mtb* dans une souche *E. coli* BL21 (DE3) pLysS portant un plasmide pET24d-*Mtb*ThyX. L'IPTG induit l'expression de l'ARN polymérase T7 dans les bactéries BL21, ce qui induit alors l'expression du gène *thyX* placé en aval du promoteur T7 sur le plasmide. La protéine ThyX *Mtb* recombinante ainsi produite, porte une étiquette poly-histidine à son extrémité N-terminale. Après surexpression, les cellules sont lysées et centrifugées afin d'en extraire les protéines solubles. J'ai découvert que l'ajout de FAD (200 μM

final), à l'extrait bactérien brut de protéines solubles, permet d'enrichir la fraction de ThyX ayant retenue son cofacteur en fin de purification. Cette méthode, qui ne fonctionne pas avec d'autres ThyXs, a permis de passer de 10% à plus de 40% de protéines ayant retenu le FAD au site actif de ThyX *Mtb*. Expérimentalement, en spectroscopie, cela permet de réduire d'une part la quantité de protéine nécessaire afin d'avoir un signal acceptable, et réduire d'autre part l'effet que peuvent avoir les sites sans FAD sur les différentes mesures que nous pouvons effectuer.

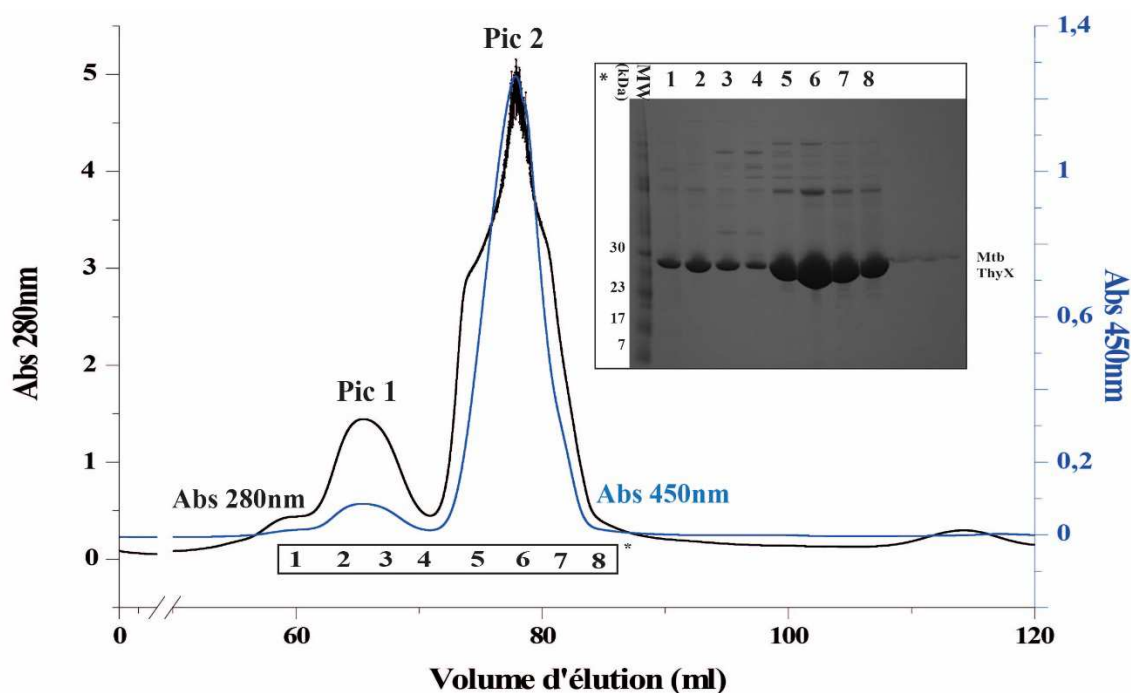


Figure 3-2 : Chromatogramme d'exclusion de ThyX *Mtb*. 180 mg (2ml) de protéines purifiées par chromatographie d'affinité sont déposés sur une colonne de chromatographie d'exclusion. *Insert : dépôt de 10 μ l d'échantillon des différentes fractions (1 ml) récoltées^(*) sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

ThyX *Mtb* est purifiée en deux étapes : par chromatographie d'affinité sur une colonne de cobalt, puis par chromatographie d'exclusion (dont le chromatogramme est présenté dans la figure 3-2). Nous observons deux

populations de ThyX *Mtb* majoritaires notées pic 1 et pic 2 sur la figure 3-2. Ces formes oligomériques de ThyX *Mtb* ont été vérifiées en MALS (Ines Gallay, résultats non publiés) : le pic 1 correspond à un dimère de tétramères tandis que le pic 2 correspond au tétramère de ThyX *Mtb*. Les protéines du pic 2 réinjectées seules dans les mêmes conditions sur la même colonne produisent un chromatogramme d'exclusion similaire à celui présentés en figure 3-2. Le tétramère et l'octamère sont donc en équilibre en solution.

De cette manière, nous produisons entre 70 et 100 mg de ThyX *Mtb* par litre de culture, avec une pureté supérieur à 95%.

3.2.2 Spécificité NADPH/NADH de ThyX *Mtb*

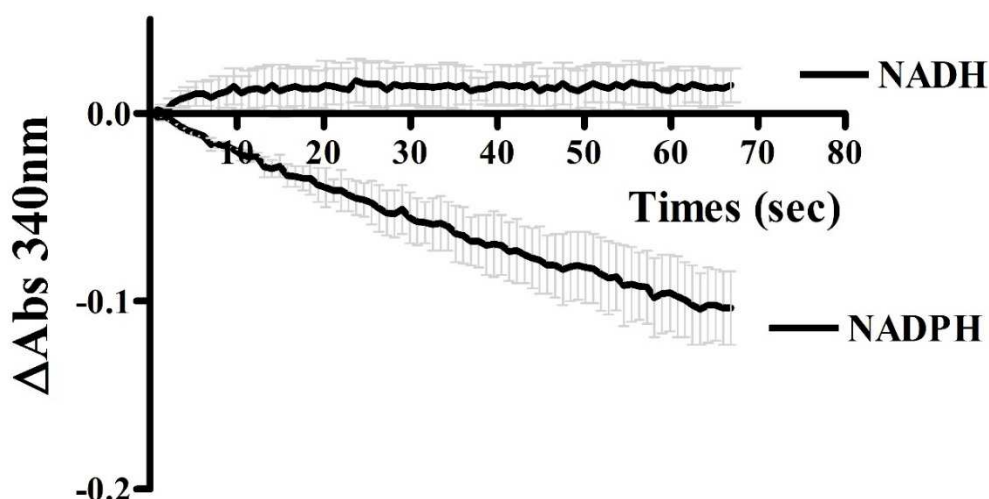


Figure 3-3 : Oxydation du NADPH ou du NADH par ThyX *Mtb* en présence de dUMP à 37°C, suivie à 340 nm en fonction du temps. Le mélange réactionnel comprend du dUMP (50 μM), du MgCl_2 (1 mM), et ThyX *Mtb* (10 μM) à pH 8. Les réactions sont démarrées par ajout de NADPH ou NADH par le lecteur de plaque muni d'un système pompe/injecteur. Les barres d'erreur correspondent à deux expériences réalisées avec deux préparations d'enzyme indépendantes.

La plupart des ThyX peuvent être réduite à la fois par le NADH et par le NADPH [71, 84, 93, 102, 113] Ces deux substrats absorbent à 340 nm sous forme réduite mais pas sous forme oxydée. La décroissance de l'absorbance en fonction du temps rend donc compte de l'activité d'oxydation du NADH/NADPH en fonction du temps.

En testant les deux substrats séparément sur différents lots de ThyX *Mtb*, j'ai montré que le NADH n'est pas oxydé par l'enzyme (Fig. 3-3). ThyX *Mtb* est sélective vis-à-vis du NADPH

Dans *Mtb*, les rapport NADPH/NADP⁺ et NADH/NAD⁺ sont d'environ 10/1 et 1/3 *in vivo* [114]. Par conséquent, le NADPH joue un rôle anabolique de donneur d'hydrure dans la bactérie tandis que le NAD⁺ joue le rôle catabolique d'accepteur d'hydrure, *in vivo*. Pris ensemble avec nos résultats, ces éléments suggèrent que le NADPH est effectivement le substrat physiologique de ThyX *Mtb*.

3.2.3 Fixation du dUMP sur ThyX-FAD

De même que dans ThyX *PBCV-1*, la fixation du dUMP dans un site actif de ThyX *Mtb* provoque un léger décalage du spectre du FAD, qualifié de *red shift*. Le spectre s'étend sur des longueurs d'onde supérieures à 480 nm, et l'absorbance décroît pour les longueurs d'onde inférieures à 480 nm. Les spectres avec et sans dUMP se coupent à 480 nm, point isosbestique des deux formes.

Le changement spectral provoqué par la fixation du dUMP permet de mesurer la cinétique de son interaction avec l'enzyme oxydée par spectroscopie résolue en temps. Le montage réalisé en stopped flow est schématisé ci-dessous. Brièvement, la concentration de ThyX *Mtb* est gardée constante tandis que je réalise une gamme de dUMP en faisant varier le ratio dUMP/tampon :

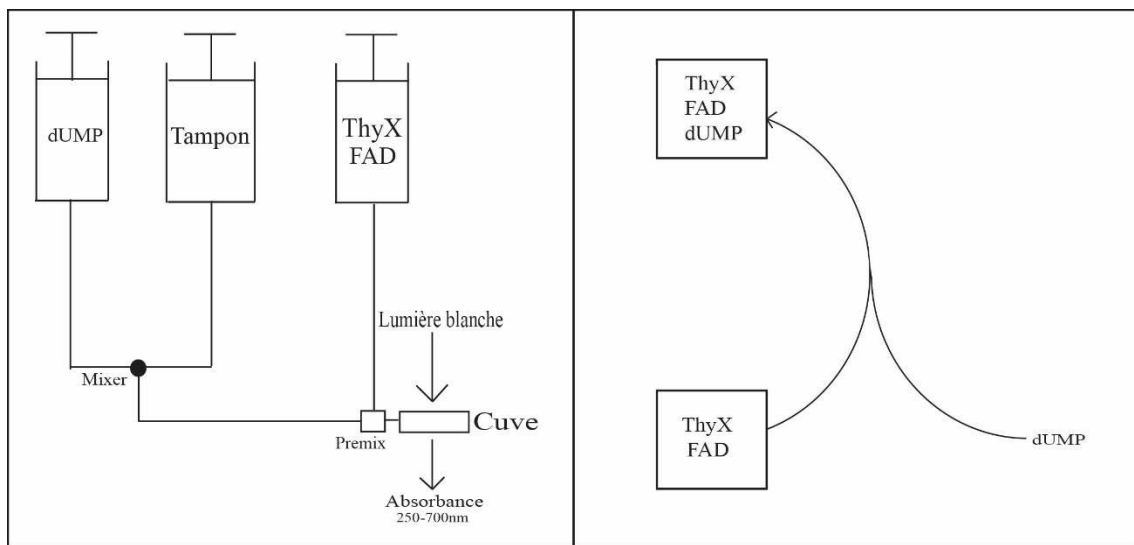


Figure 3-4 : Schéma de stopped flow mis en place. Une concentration constante de ThyX-*Mtb* est mélangée avec différentes concentrations de dUMP en jouant sur le ratio dUMP/tampon.

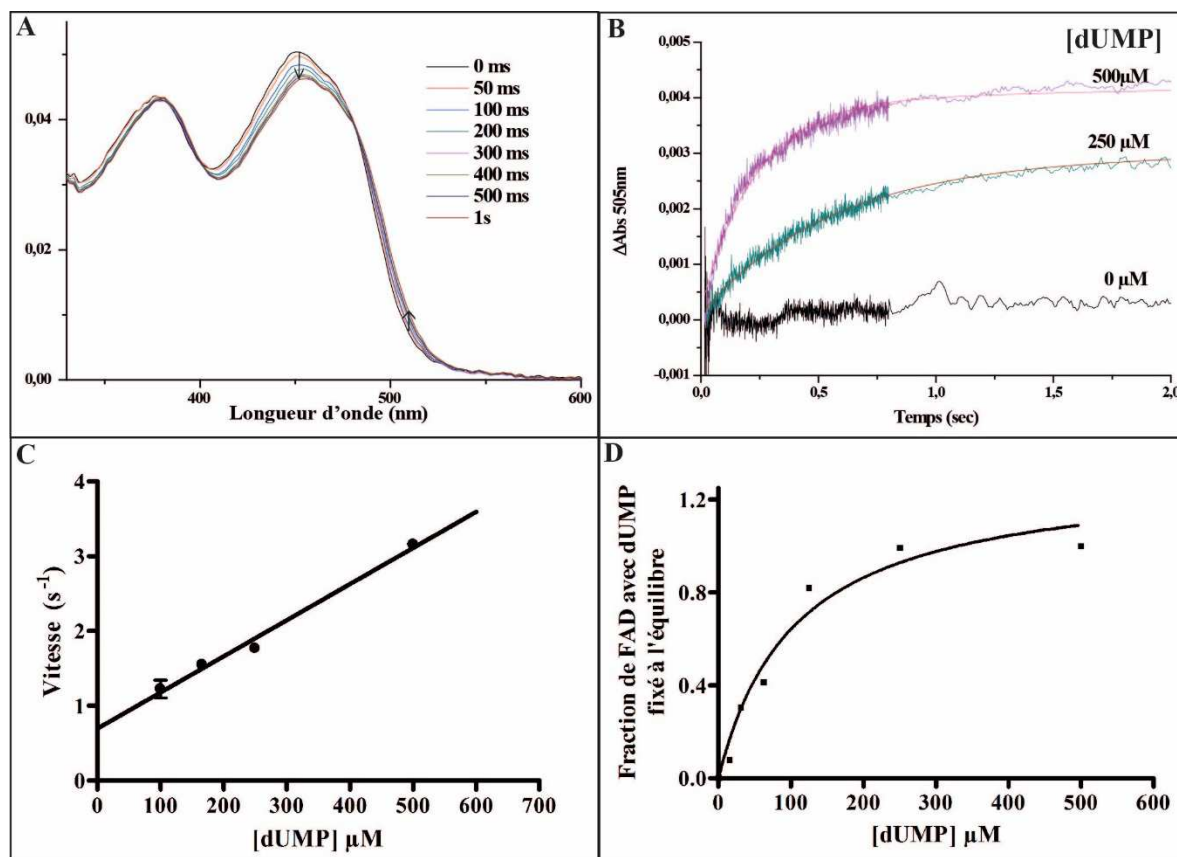
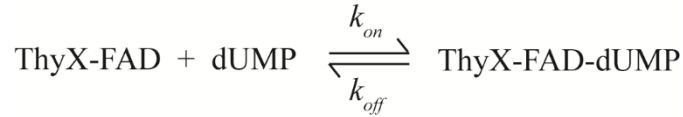


Figure 3-5 : Fixation du dUMP au site actif de ThyX *Mtb*, mesuré en cinétique rapide. 50 μM de ThyX-FAD (500 μM de ThyX) est injecté dans la cuve de l'appareil de stopped flow avec une concentration croissante de dUMP (0 μM ; 100 μM ; 166 μM ; 250 μM , 500 μM) et les spectres sont mesurés toutes les 0.8ms pendant 800 ms puis moyennés sur 8 ms pendant 7 s. A) Observation du changement spectral de la flavine lorsque le dUMP (500 μM) occupe le site actif dans ThyX *Mtb* à différents temps. B) Cinétique de la fixation du dUMP observée à 505nm. Les lignes correspondent à l'ajustement à l'équation (8) (voir texte). C) Vitesse de fixation du dUMP en fonction du temps ; les vitesses sont extraite des cinétiques à 505nm, D) Mesure de la fixation de dUMP (0 μM ; 16 μM ; 31,25 μM ; 62,5 μM ; 125 μM ; 250 μM ; 500 μM) sur 50 μM de ThyX-FAD à l'équilibre. Les mélanges sont réalisés dans des cuves en quartz. Le mélange est réalisé plusieurs minutes avant les mesures. Un spectre est mesuré pour chaque condition. La fixation du dUMP est estimée en fonction de la diminution de la pente du spectre de 485 à 505 nm. 1 correspond au maximum de FAD-dUMP observé à l'équilibre (1/10 ThyX-FAD/dUMP).

Nous nous intéressons à la cinétique de fixation du dUMP sur *Mtb* ThyX-FAD qui s'observe par une modification du spectre de la flavine (Fig. 3-5.A), similaire à l'effet observé dans le chapitre 2 sur ThyX *PBCV-1* (Fig. 2-2.D).

Nous avons :



En mesurant le changement spectral, nous observons la formation du complexe ThyX-FAD-dUMP :

$$\frac{d[\text{ThyX} \cdot \text{FAD} \cdot \text{dUMP}]}{dt} = k_{on}[\text{dUMP}][\text{ThyX} \cdot \text{FAD}] - k_{off}[\text{ThyX} \cdot \text{FAD} \cdot \text{dUMP}] \quad (5)$$

Dans notre cas, la concentration [dUMP] est toujours supérieure à la concentration de la flavine. En approximant pour $[\text{dUMP}]_t = [\text{dUMP}]_0$, la concentration de dUMP à l'instant t et à t=0 respectivement, nous montrons en annexe 4 que :

$$[\text{ThyX} \cdot \text{FAD} \cdot \text{dUMP}]_t = \frac{k_{on}[\text{FAD}]_0[\text{dUMP}]}{k_{on}[\text{dUMP}] + k_{off}} (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) \quad (6)$$

$$\text{où} \quad k_{obs} = k_{on} \cdot [\text{dUMP}] + k_{off} \quad (7)$$

k_{on} et k_{off} sont les constantes de vitesse de formation et de dissociation du complexe et s'expriment en $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et en s^{-1} respectivement.

Nous mesurons une augmentation de l'absorbance à 505 nm lors de la formation du complexe ThyX-FAD-dUMP, et les changements de sa concentration en fonction du temps se traduisent en variations d'absorbance. Nous avons donc approximé les cinétiques mesurées (Fig. 3-5.B) à l'équation (8), dans le programme Bio-kine :

$$A = at + b + A_0 \cdot e^{-k_{obs} \cdot t} \quad (8)$$

où nous retrouvons le terme exponentielle qui décrit la formation du complexe ThyX-FAD-dUMP ainsi qu'un terme linéaire. Le terme linéaire corrige pour les événements qui ne correspondent pas à la réaction (photo-réduction, sensibilité du détecteur en fonction du temps, etc). L'équation (8) s'ajuste avec un coefficient de corrélation supérieur à 0.90.

La vitesse observée de fixation du dUMP, K_{obs} , augmente linéairement en fonction de sa concentration (Fig. 3-5.C) et l'équation (7) s'ajuste avec un coefficient de corrélation de 0.98. Nous pouvons en extraire un k_{on} de $4.82 \pm 0.20 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, un k_{off} de $0.69 \pm 0.08 \text{ s}^{-1}$ (Fig. 3-5.C). Pour $K_d = \frac{K_{off}}{K_{on}}$, nous calculons une constante de dissociation de $142 \pm 12 \text{ } \mu\text{M}$ dans ces conditions.

Nous avons vérifié ce résultat par une mesure de la fixation du dUMP sur ThyX-FAD à l'équilibre (Fig. 3-5.D). Dans ces conditions, nous avons approximé la courbe de saturation à l'équation de Morrison (9) (Copeland RA, enzymes a practical introduction to structure, mechanism and data analysis. 2000. Wiley VCH) qui lie la fraction de complexe formé par rapport à l'équilibre, en fonction de la concentration de ligand et de protéine :

$$\frac{[E - U]}{[E - U]_{eq}} = \frac{[U] + [E] + K_d - \sqrt{([U] + [E] + K_d)^2 - 4[E][U]}}{2[E]} \quad (9)$$

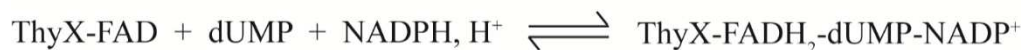
Où [E] est la concentration de ThyX-FAD, [U] est la concentration de dUMP, [E-U] est la concentration du complexe ThyX-FAD-dUMP et K_d est la

constante de dissociation du complexe ThyX-FAD-dUMP. L'équation (9) s'ajuste avec un coefficient de corrélation de 0.96. Cette approximation nous donne un $K_d = 106 \pm 11 \mu\text{M}$, en accord avec celle calculée par cinétique.

Les constantes de vitesse d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) du dUMP en absence de NADPH sur ThyX *Mtb* sont 4 et 11 fois plus faible que dans ThyX *PBCV-1*, respectivement ([90], Fig. 3-5.C). Cela rend compte du site actif moins accessible pour le dUMP dans ThyX *Mtb*.

3.2.4 Réduction de ThyX-FAD par le NADPH en présence de dUMP

Afin de mesurer la réduction de l'enzyme par le NADPH, nous nous sommes à nouveau servis de la spectroscopie résolue en temps. Nous précisons que « réduction » est *stricto sensu* un abus de langage et nous nous intéressons ici au transfert d'hydrure (un proton et deux électrons) du NADPH vers le FAD :



Le dUMP peut se fixer sur l'enzyme oxydée, ThyX-FAD, et l'enzyme ne se réduit pas en absence de dUMP. C'est pourquoi dans ce cas, l'enzyme est pré incubée avec le dUMP avant le début de l'expérience. De même que précédemment, l'expérience de stopped flow est réalisée suivant le schéma ci-dessous. Dans ce cas, un mélange de ThyX-FAD et de dUMP est gardé à concentration constante alors que nous augmentons la concentration du NADPH au cours de l'expérience, en faisant varier le ratio NADPH/tampon

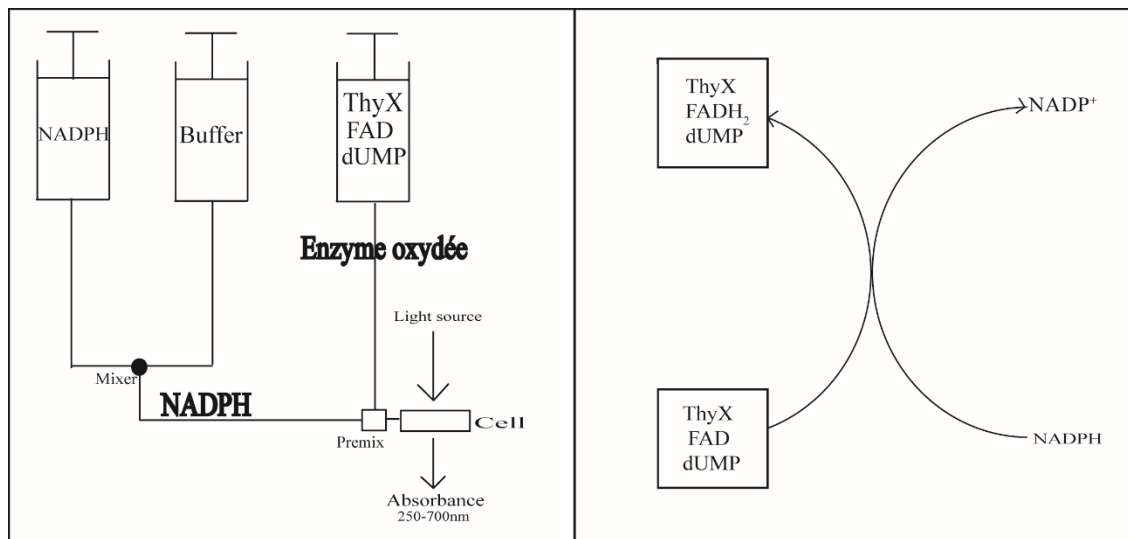


Figure 3-6 : Schéma de stopped flow mis en place. L'enzyme est pré incubée avec du dUMP en excès. Le mélange est injecté dans la cuve de l'appareil de stopped-flow avec une concentration croissante de NADPH en conditions anaérobies.

Cela permet d'effectuer une gamme de NADPH pour une concentration constante d'enzyme et de dUMP pré-incubé. L'O₂ en solution pourrait ré-oxyder le FADH₂ vers la forme FAD. Afin de bloquer la réaction après un turn-over, cette expérience a été réalisée en conditions anaérobies : Un mélange glucose oxidase et catalase (0.3 u/μl) est ajouté aux solutions. Elles sont préparées dans des vials, scellées par un stoppeur étanche au gaz et soumise à plusieurs cycles de lavage vide/argon. Le glucose est préparé de la même manière et est ajouté au mélange avant de répéter les cycles de lavage. Cette démarche a été appliquée extemporanément pour toutes les expériences en conditions anaérobies.

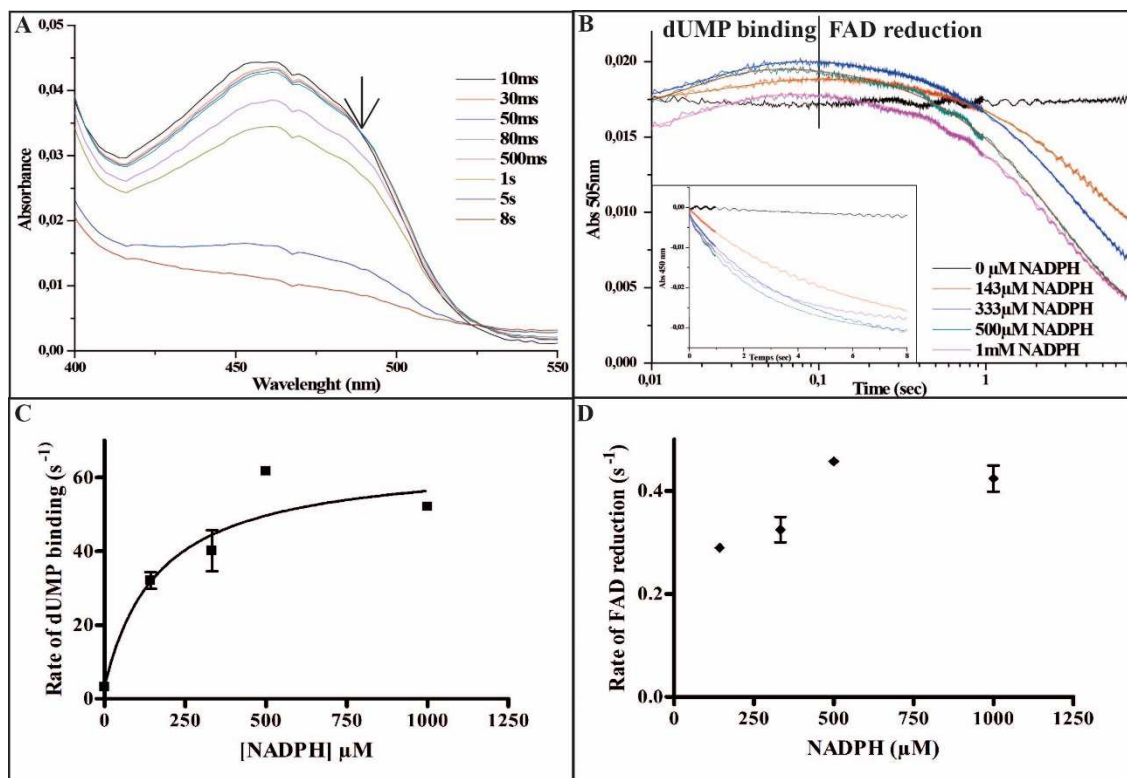


Figure 3-7 : Réduction du FAD dans ThyX *Mtb*, mesurée par spectroscopie résolue en temps. 50 μM de ThyX-FAD (500 μM de ThyX) pré-incubé avec du dUMP (500 μM) est mélangé dans la cuve avec une concentration croissante de NADPH en conditions anaérobies. A) Evolution du spectre de la flavine après ajout du NADPH (333 μM), la flèche indique le point isobestique pour la fixation du dUMP. B) Cinétiques de fixation du dUMP et de réduction de la flavine, mesurées à 505 nm pour différentes concentrations en NADPH. Insert : cinétiques mesurées à 450 nm extraites de la même dans les mêmes conditions. C : Vitesse de fixation du dUMP (extraites des mêmes résultats bruts. C) Vitesse observée de la phase croissante de la courbe à 505 nm (Fig. 3-7 B) en fonction de la concentration en NADPH. Le point à 0 est extrait de la figure 3-5C (500 μM dUMP, 0 μM NADPH). D : Vitesse observée de la phase décroissante de la courbe à 505 nm (Fig. 3-7 B) en fonction de la concentration en NADPH.

Nous avons observé deux modifications spectrales successives de la flavine lors de l'ajout du NADPH : d'abord une augmentation de l'absorbance dans les longueurs d'onde supérieures à 480 nm (100 ms), puis une disparition globale du spectre de la flavine (7 s, Fig. 3-7.A et B). Nous avons interprété la première comme une fixation de dUMP, les spectres étant caractéristiques de cet événement, et la seconde comme une réduction du FAD par NADPH.

Le dUMP est préincubé avec l'enzyme et nous ajoutons à ce mélange le NADPH. Nous observons donc dans un premier temps une fixation de dUMP induite par la fixation du NADPH. Cela implique trois choses : i) en absence de NADPH, chaque site n'a pas fixé une molécule de dUMP dans les conditions du test ; ii) la fixation du NADPH induit la fixation du dUMP dans les sites encore libres iii) la fixation du dUMP sur ThyX-FAD-NADPH est sensiblement plus rapide que sur ThyX-FAD (25 et 300 ms respectivement).

La diminution de l'absorbance à 505nm (Fig. 3-7.B) correspond à la réduction du FAD en FADH₂, avec un spectre final caractéristique de flavine réduite (Fig. 3-7.A). Cette interprétation est soutenue des cinétiques similaires à 450 nm (Fig. 3-7B, insert) et par l'oxydation couplée du NADPH (observable à 340 nm, non montré).

Afin de rendre compte des différents évènements observés, j'ai analysé les cinétiques à 505 nm, car comme expliqué en partie 2.1.2, 505 nm permet de distinguer les deux évènements dans la cinétique qui induisent des variations d'absorbance au signes inverses.

Nous savons qu'une proportion de la population d'enzyme fixe le dUMP dans le site actif en absence de NADPH. Dans nos conditions, l'enzyme est préincubée avec le dUMP. Par conséquent, nous n'observons cette population d'enzymes qu'à $t = 0$. La cinétique mesurée (Fig. 3-7.B) rend compte de nouvelles fixations et nous observons précisément une fixation de dUMP qui fait

suite à celle du NADPH sur une population d'enzyme qui n'aurait donc pas précédemment fixé le dUMP. Cela nous amène à supposer que la fixation du NADPH induit des changements conformationnels du site actif qui facilitent l'entrée du dUMP. Si nous posons ce mécanisme, nous obtenons le schéma théorique suivant :

où ThyX* représente la forme d'enzyme pour laquelle la fixation du dUMP est provoquée par la fixation du NADPH.

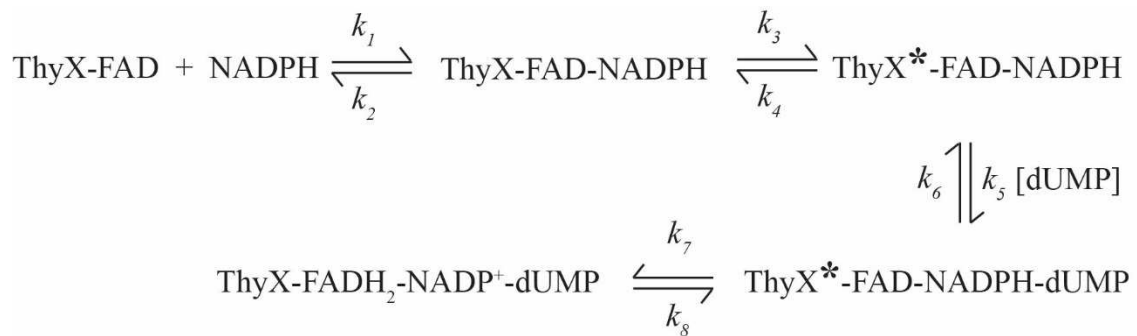


Figure 3-8 : Schéma de la réaction observée dans la figure 3-7.B lorsque le dUMP se fixe en conséquence de la fixation du NADPH à *Mtb* ThyX-FAD

Nous observons successivement la fixation du dUMP et le transfert d'hydrure du NADPH vers le FAD. Nous montrons en annexe 5 que pour le schéma des deux réactions consécutives observées :



Où A, B et C sont les formes FAD, FAD·dUMP et FADH₂, l'expression de leurs concentrations respectives en fonction du temps est :

$$A = A_0 e^{-k_1 t} \quad (10)$$

$$B = \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (11)$$

$$C = A_0 - A_0 e^{-k_1 t} - \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (12)$$

En définissant les coefficients d'extinction molaire respectifs des formes FAD, FAD·dUMP et FADH₂ : ε_{FAD} , $n^* \varepsilon_{FAD}$, et $m^* \varepsilon_{FAD}$, nous démontrons que la somme des absorbance de ces trois formes de flavine à 505 nm en fonction du temps aura la forme :

$$Abs_{505\text{ nm}} = A_0 * \varepsilon_{FAD,505\text{ nm}} * l \left[\left(1 + \frac{(n-m)k_1}{k_2 - k_1} - m \right) e^{-k_1 t} + \left(\frac{(m-n)k_1}{k_2 - k_1} \right) e^{-k_2 t} + m \right] \quad (13)$$

Cette relation est décrite par la somme de deux fonctions exponentielles. Nous avons donc approximé les courbes présentées dans la figure 3-7.B à l'équation (14).

$$A = at + b + A_0 e^{-K_{obs1} t} + A_1 e^{-K_{obs2} t} \quad (14)$$

Où K_{obs1} est la vitesse observée de la première phase (absorbance croissante), K_{obs2} est la vitesse observée de la seconde (absorbance décroissante), et A_0 et A_1 sont les amplitudes des deux phases qui ont ici un sens opposé. Ces vitesses dépendent toutes les deux de la concentration en NADPH dans le mix,

seule variable dans l'expérience, et peuvent donc être exprimées en fonction de [NADPH].

Nous pouvons voir dans la figure 3-7.C que la vitesse de fixation du dUMP, très faible en absence de NADPH (3 s^{-1} , Fig. 3-5 C), augmente en fonction de la concentration en NADPH (jusqu'à 60 s^{-1} , Fig. 3-7 C), suivant une forme hyperbolique.

Copeland et al. [115] ont décrit ce mécanisme, illustré figure 3-8 : la concentration croissante en NADPH pousse l'équilibre vers la droite de la réaction (Fig. 3-8), accumulant la forme ThyX*-NADPH, d'où la forme hyperbolique :

$$K_{obs1} = X + \frac{Y \cdot [NADPH]}{[NADPH] + K_{d_{NADPH}}} \quad (15)$$

Où X et Y dépendent des constantes de k_1 à k_6 dans la figure 3-8. Néanmoins, nous avons accès au Kd du NADPH, calculé à $167 \mu\text{M}$ ($R^2=0.91$).

Il semble ainsi que, de même que dans ThyX *PBCV-1* [90], la fixation du NADPH facilite grandement l'interaction entre ThyX *Mtb* et le dUMP. Le dUMP et le NADPH peuvent tous deux se fixer sur ThyX-FAD, mais l'ordre [NADPH puis dUMP] semble d'autant plus favorisé dans ThyX *Mtb*. Cet ordre de fixation a également été observé pour ThyX *PBCV-1* [90]. Il y a cependant une différence de degré entre les deux enzymes : En absence de NADPH, les constantes de vitesse d'association et de dissociation du dUMP sont plus faibles

pour ThyX *Mtb*. Par conséquent, à l'équilibre, seule une faible proportion d'enzyme sera sous forme complexée au dUMP, en absence de NADPH. Nous discuterons des implications de ce résultat dans la partie 3.3 Discussion.

Après fixation des substrats, nous observons la réduction de la totalité de la population de flavine dans ThyX *Mtb*, avec une vitesse apparente maximale de $0.45 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ (Fig. 3-6.D). ThyX ayant la constante catalytique la plus faible (0.68 min^{-1}), il n'est pas surprenant que le temps de réduction de la flavine soit supérieur à 2 s.

3.2.5 Ré-oxydation du FADH₂ par l'ajout de CH₂H₄Folate

Dans la réaction globale catalysée par ThyX, l'étape suivante correspond au transfert de méthylène et la ré-oxydation de la flavine, produisant du dTMP. Afin d'observer la cinétique du transfert d'hydrure du FADH₂ vers le méthylène, nous injectons une concentration croissante de CH₂H₄folate sur un mélange anaérobie de ThyX-dUMP-NADPH, enzyme pré réduite dans l'appareil de stopped flow, et nous observons la réaction en spectroscopie. Le montage de l'expérience de stopped-flow réalisé est schématisé ci-dessous. Un mélange de ThyX-FAD et dUMP est pré-réduit par le NADPH extemporanément en conditions anaérobies. La gamme de concentration de CH₂H₄folate est réalisée en augmentant progressivement le rapport CH₂H₄folate/Tampon tandis que la concentration finale du mélange contenant l'enzyme pré-réduite est gardée constante :

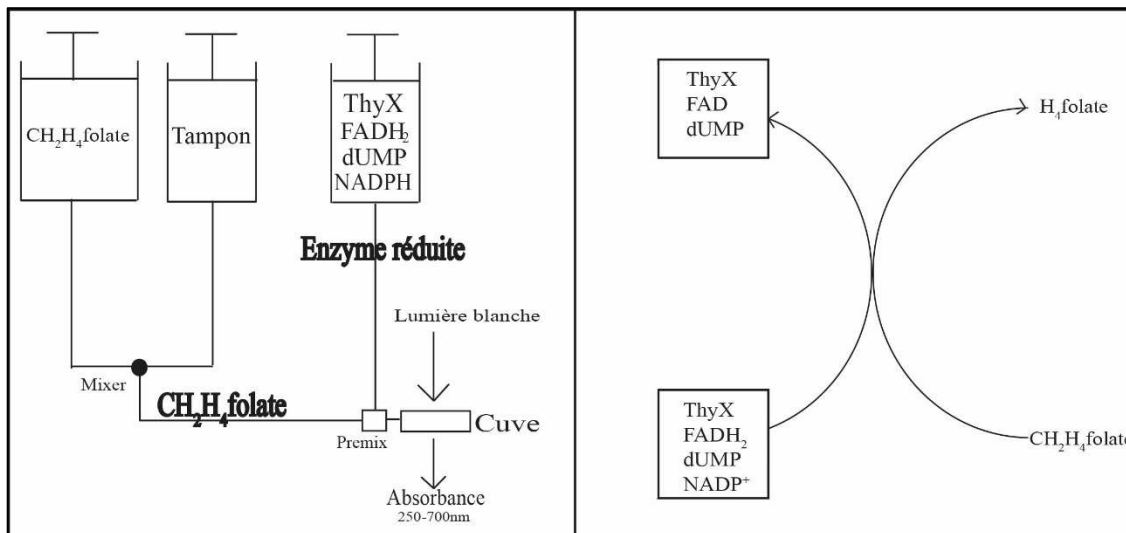
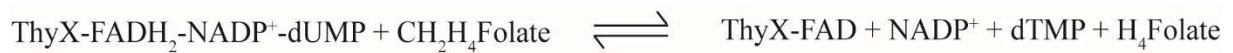


Figure 3-9 : Schéma de Stopped flow mis en place. L'enzyme est pré-réduite par un excès de NADPH en présence de dUMP, puis est mélangée avec différentes concentrations en $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$ en conditions anaérobies.



Afin de disposer de l'enzyme sous forme réduite et d'éviter la contamination par le dioxygène, je me suis placé dans ce cas en excès de NADPH et en conditions anaérobies.

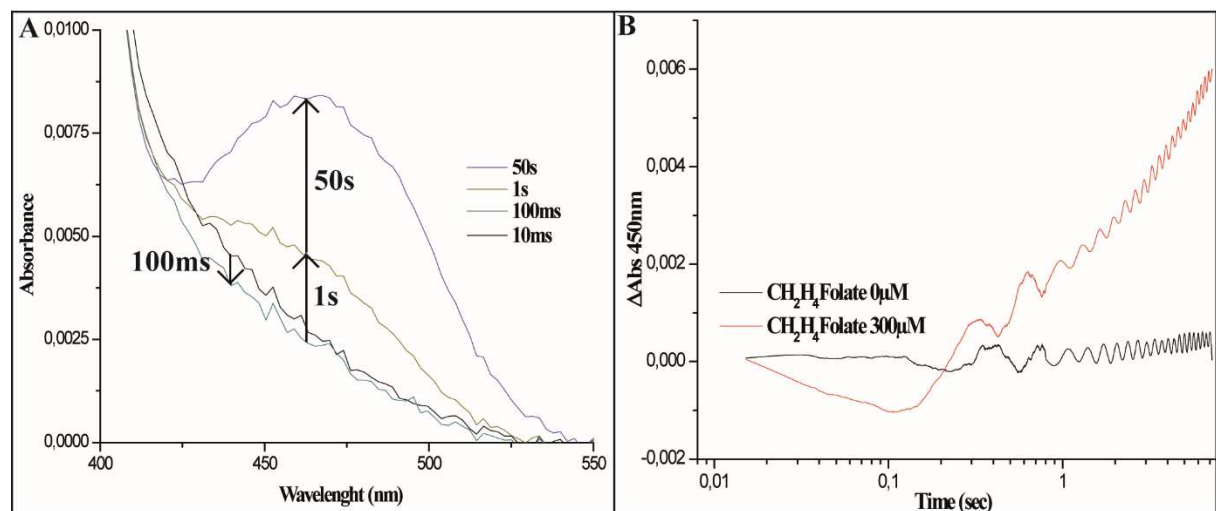


Figure 3-10 : Ré-oxydation du FADH_2 dans ThyX *Mtb* par le $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$ mesurée en spectroscopie résolue en temps. 50 μM de ThyX-FAD *Mtb* (500 μM de ThyX *Mtb*), incubé avec du dUMP (500 μM) et pré-réduite par du NADPH (1mM) en conditions anaérobies est mélangée avec différentes concentrations de $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$ (300 μM). A) Spectres mesurés à différents temps après le mélange de l'enzyme pré-réduite avec le $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$ (300 μM). B : Cinétique mesurée de ré-oxydation de la flavine par le $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$.

Les différents évènements décrits sont observables à la fois sur les spectres et sur la cinétiques (Fig. 3-10.A et .B). Afin de réduire le bruit électronique (oscillations sur la cinétiques dans la figure 3-10.B), les cinétiques présentées ont été lissées grâce à la fonction « smoothing » du programme Origin en raison du bruit électronique important qui a parasité nos mesures, visible par une oscillation à période constante sur les cinétiques dans la figure 3-10 (attention à l'échelle logarithmique). Le signal est cependant significatif par rapport au bruit, et ces résultats restent exploitables.

Nous avons pu observer dans un premier temps une baisse de l'absorbance autour de 420nm jusqu'à 100ms. La même observation a déjà été faite pour la ThyX de *Thermatoga maritima* [88], et semble être conservé dans la ThyX de *Mycobacterium tuberculosis*. Il s'agirait d'un intermédiaire de réaction mais sa nature n'a pas encore été précisément déterminée.

L'augmentation de l'absorbance à 450nm correspond à la ré-oxydation de la flavine et se fait en deux phases : une première, rapide (6 s^{-1}) et une seconde, plus lente (0.1 s^{-1}).

L'hétérogénéité dans la cinétique de ré-oxydation de la flavine suggère qu'il y a une population d'enzyme ou de folate qui ne réagit pas et la réaction semble limitée dans l'ensemble. En fin de réaction (plateau observé de 30 à 192 s), seule 25% de la population de flavine est réoxydée après addition de

CH₂H₄folate. Cela suggère que cette étape de la réaction, ou une étape précédente limite la réaction.

3.2.6 Activité NADPH oxydase de ThyX *Mycobacterium tuberculosis* :

Nous avons montré que la réduction du FAD par un excès de NADPH dans ThyX *PBCV-1*, en présence d'O₂, induisait le maintien d'une quantité stable de la forme ThyX-FADH₂. La ré-oxydation après l'addition de CH₂H₄folate (> 1000 s⁻¹) est plus rapide que la ré-oxydation par l'O₂ (1.5 s⁻¹) dans ThyX *PBCV-1*, favorisant la réaction avec le CH₂H₄folate en conditions aérobie (Chapitre 2, [90]).

La réactivité de la ThyX de *Mycobacterium tuberculosis* par rapport au dioxygène est d'un grand intérêt car il a été montré que l'enzyme était non seulement nécessaire mais aussi suffisante *in vivo*, dans une bactérie aérobie stricte. Les actions du dioxygène et des oxydants cellulaires en général sont d'autant plus importants dans le cas de *Mtb* car cette bactérie est soumise à un stress oxydatif important dans son environnement naturel : le macrophage [13]. ThyX *Mtb* est donc supposée être capable d'assurer la synthèse de dTMP malgré le stress oxydatif et en absence de ThyA [44].

J'ai tenté de mesurer la vitesse de ré-oxydation de l'enzyme par O₂. Afin de mesurer la vitesse de cette réaction, je mélange dans l'appareil de stopped-flow une concentration croissante de NADPH sur un mélange de ThyX-FAD et de dUMP préincubé, en conditions aérobies (Fig. 3-11).

Le but est de mesurer la réduction de la flavine par le NADPH puis sa ré-oxydation par O_2 . Il est important de noter ici que nous ne sommes pas dans les conditions d'un test en turnover unique, comme schématisé également dans la figure 3-11.

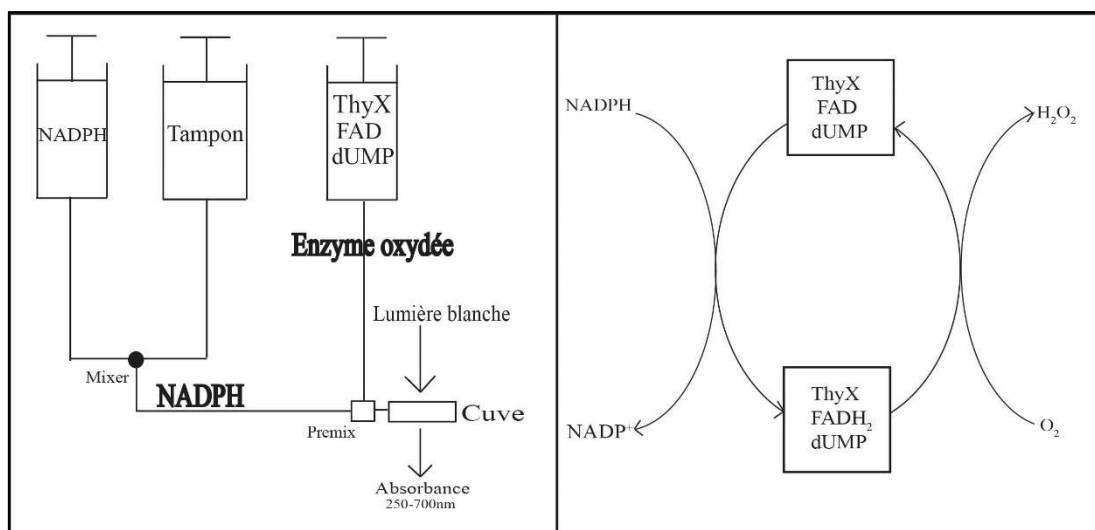


Figure 3-11 : Schéma de stopped flow mis en place et de la réaction étudiée. L'enzyme oxydée et pré-incubée avec du dUMP est mélangée à différentes concentrations en NADPH en présence d' O_2 .

Les résultats sont présentés en figure 3-12 :

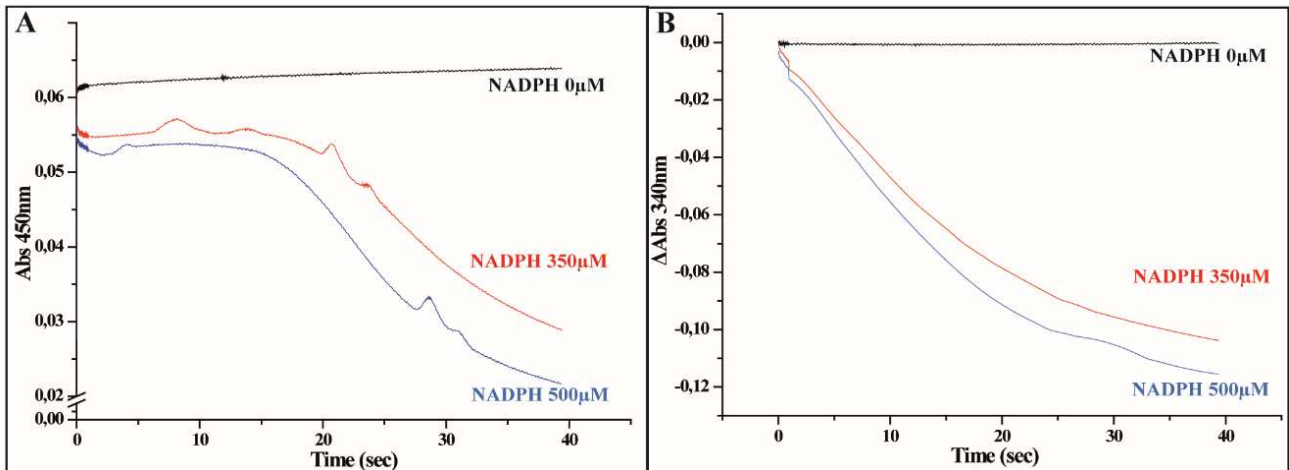


Figure 3-12 : Ré-oxydation de ThyX *Mtb* par le dioxygène. 500 μM de ThyX *Mtb* (50 μM de ThyX-FAD) incubée avec 500 μM de dUMP est mélangée avec différentes concentration de NADPH (0 μM ; 350 μM ; 500 μM) pendant l'expérience dans l'appareil de stopped flow en conditions aérobies. Les spectres sont enregistrés toutes les 0.8 ms pendant 40 s.

Nous observons à 450 nm la flavine (Fig. 3-12.A) et à 340 nm, l'oxydation du NADPH (Fig. 3-12.B). Nous pouvons voir dans la cinétique à 450 nm (Fig. 3-12.A) que la réduction de la flavine est précédée par une phase de latence.

Pendant cette phase de latence, il est tentant de penser que la flavine ne réagit pas. Cette hypothèse a même été avancée par le passé [116, 117]. Cependant, durant cette phase de latence (de 0 à 10 - 15 secs), nous pouvons voir que l'oxydation du NADPH a effectivement lieu (Fig. 3-12.B). Cela suggère que la flavine est elle aussi réduite mais que sa vitesse de ré-oxydation par le dioxygène est trop élevée par rapport à sa vitesse de réduction (que nous savons par ailleurs très faible : 0.4 s^{-1}) pour être observée ici. Cette interprétation est soutenue par le fait que les deux cinétiques atteignent un plateau simultanément : En absence d' O_2 et de $\text{CH}_2\text{H}_4\text{Folate}$, aucun oxydant capable de

réagir avec le FADH₂ n'est présent dans le mix réactionnel d'où l'accumulation de ThyX-FADH₂. Nous sommes dans le cas de deux réactions successives :



avec ThyX-FADH₂, le produit intermédiaire, qui n'est pas observable si $k_2 \gg \gg k_1$ (Annexe 3).

La réduction du FAD (450nm) par le NADPH (340nm) en présence d'O₂, dans la ThyX de *Mycobacterium tuberculosis* induit le maintien d'une quantité stable de ThyX-FAD. Il semble qu'en conditions aérobies, il n'est possible de maintenir ThyX *Mtb* sous forme réduite qu'une fois le dioxygène dans le milieu consommé.

La flavine dans ThyX-Mtb réagit très lentement avec le NADPH et très rapidement avec O₂. C'est l'inverse de ce qui a été observé pour ThyX *PBCV-1*

Tableau 3 : Vitesse de transfert d'hydrure de et vers la flavine dans ThyX *Mtb* et ThyX *PBCV-1*

	ThyX <i>Mtb</i>	ThyX <i>PBCV-1</i>
Réduction par NADPH	0.4 s ⁻¹	40 s ⁻¹
Oxydation par O ₂	>>> 0.4 s ⁻¹	1.5 s ⁻¹

Afin de vérifier si le comportement inverse de la flavine dans les deux enzymes n'est pas dû à une différence dans le potentiel standard du cofacteur, j'ai entrepris de le mesurer par spectroélectrochimie.

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec Veronique Balland du Laboratoire d'Electrochimie Moléculaire de l'Université Paris Diderot (Paris VII).

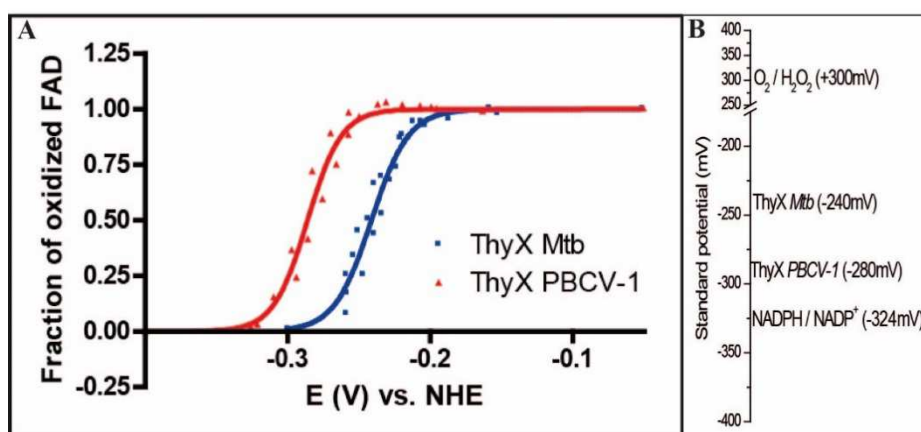


Figure 3-13 : A. Fraction de ThyX-FAD oxydée, mesurée par l'absorbance à 450 nm en fonction du potentiel appliqué. B. Echelle de potentiel standard pour les couples NADPH/NADP⁺, FAD/FADH₂ dans ThyX PBCV-1 et ThyX Mtb, et O₂/H₂O₂.

Les potentiels standard de la flavine dans ThyX Mtb et dans ThyX PBCV-1 diffèrent, mesurés respectivement à -241 ± 1 mV et -286 ± 1 mV (Fig. 3-13.A). D'après l'échelle de potentiel standard présentée dans la figure 3-13.B, nous nous attendons à ce que la force motrice pour le transfert d'hydrure du NADPH vers la flavine dans ThyX Mtb soit plus importante que pour la flavine dans ThyX PBCV-1 (et inversement pour le transfert d'hydrure de la flavine vers l'O₂). Or, la vitesse des réactions mesurées, résumées dans le tableau 3, montre une tendance inverse.

Nous concluons que les différences de réactivité de la flavine, dans les différentes ThyX testées, ont des causes structurales et non purement thermodynamiques.

3.2.7 Activité thymidylate synthase versus activité NADPH oxydase

Etant donné la réactivité de l'enzyme vis-à-vis du dioxygène, j'ai entrepris d'étudier la relation entre les deux activités de ThyX *Mtb* dans différentes conditions.

Il a été montré que le dioxygène et le CH₂H₄folate étaient en compétition pour le même site dans ThyX [110] et nous pouvons observer une inhibition

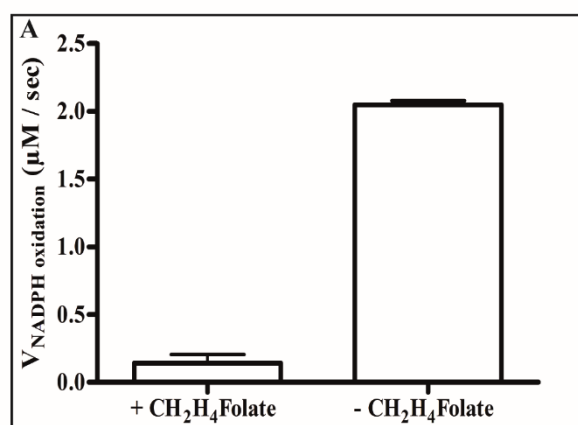


Figure 3-14 : Vitesse d'oxydation du NADPH par ThyX *Mtb* en présence de dUMP, et en présence et en absence de CH₂H₄Folate, en conditions aérobies.

apparente de l'activité NADPH oxydase de ThyX *Mtb* par le CH₂H₄folate :

Nous pouvons voir dans la figure 3-14 qu'en présence de CH₂H₄folate, il y a une inhibition apparente de l'oxydation du NADPH. Cette pseudo-inhibition rend en réalité compte des différences des vitesses de réaction faisant intervenir le CH₂H₄folate et le dioxygène. Cette observation met également en évidence le fait que le CH₂H₄folate, rivalise significativement avec l'O₂ pour l'enzyme réduite (ThyX-FADH₂).

3.2.7.1 Spécificité de fixation du CH₂H₄Folate :

Le CH₂H₄Folate et l'O₂ sont en compétition pour l'enzyme sous forme ThyX-FADH₂ [110], l'oxydation de *Mtb* ThyX-FADH₂ par O₂ est extrêmement efficace (3.2.6 Activité NADPH oxydase de ThyX *Mtb*) et le CH₂H₄folate rivalise significativement avec l'O₂ dans cette compétition (Fig. 3-14).

L'affinité du CH₂H₄folate pour ThyX *Mtb* joue un rôle fondamental dans la compétition avec l'O₂. J'ai donc testé d'autres dérivés de folate très proches structuralement (le H₄folate, produit de la réaction, et le CH₃H₄folate) afin d'obtenir plus d'informations sur les modalités de fixation du CH₂H₄folate sur ThyX *Mtb*.

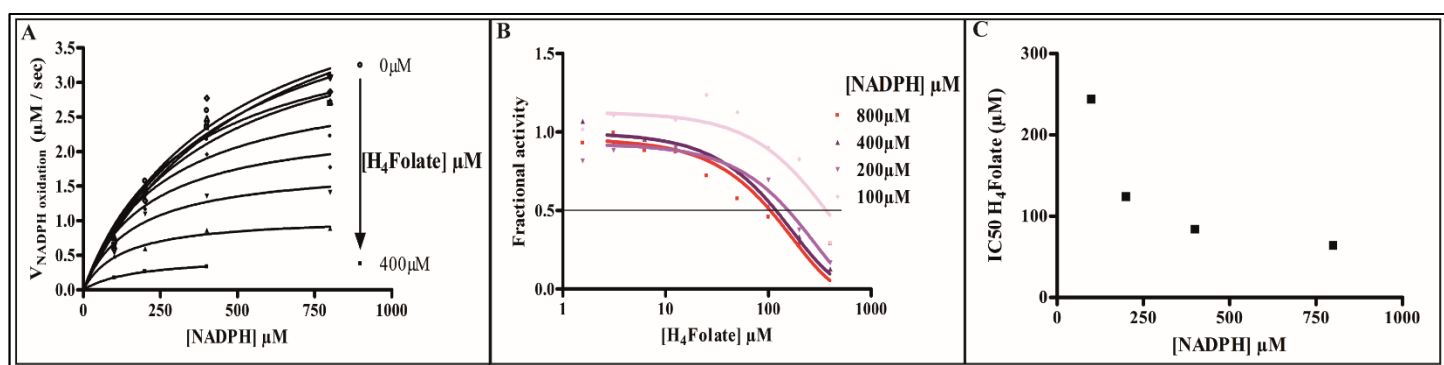


Figure 3-15 : Inhibition de l'activité d'oxydation du NADPH de ThyX *Mtb* par le H₄folate. Le H₄folate est titré pour différentes concentration en NADPH. A) Activité d'oxydation du NADPH pour différentes concentrations de H₄Folate ajoutées. B) Activité relative d'oxydation du NADPH en fonction de la concentration en H₄Folate. C) Concentration de H₄Folate nécessaire à 50% d'inhibition de l'activité d'oxydation du NADPH (IC₅₀) en fonction de la concentration [NADPH]. 100% correspond à l'activité en absence de H₄Folate.

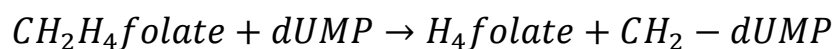
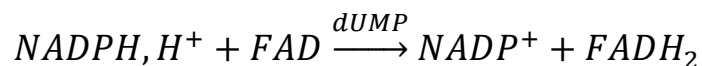
Nous pouvons voir dans la figure 3-15 que le H₄folate inhibe l'activité d'oxydation du NADPH de ThyX *Mtb* de manière dose-dépendante. La concentration en H₄folate nécessaire pour inhiber 50% de l'activité (et donc d'enzyme) diminue en fonction de la concentration en NADPH. L'inhibition de l'activité NADPH oxydase par le H₄folate est par conséquent, incompétitive (pour un rappel sur les types d'inhibition et leur détermination, voir partie 4-1). En d'autres termes, la fixation du NADPH facilite la fixation du H₄folate.

Parallèlement, aucun effet n'a été détecté en présence de CH₃H₄Folate, le « piège à méthyle » cellulaire.

3.3 Discussion

Nous nous sommes appliqués dans cette partie à décortiquer la cinétique du mécanisme de ThyX *Mtb* en mettant l'accent sur la réactivité d'oxydo-réduction de son cofacteur FAD, modulée à la fois par l'enzyme elle-même et par les différents substrats. Les conclusions principale qui découlent de ce travail peuvent être énumérées : i) ThyX *Mtb* est NADPH-spécifique. ii) la fixation du dUMP est améliorée par celle du NADPH iii) le dUMP et le NADPH régulent tous les deux l'initiation de la réaction, limitant ainsi l'accumulation de la forme ThyX-FADH₂, très réactive avec le dioxygène iv) le CH₂H₄folate rivalise significativement avec le dioxygène, dirigeant l'activité vers la synthèse de dTMP au lieu du H₂O₂. Le site actif très dynamique de ThyX *Mtb* accomode tous ces acteurs, et constitue ainsi une large scène dont nous nous sommes efforcés de comprendre les scenarii.

Nous avons distingué dans l'introduction plusieurs parties de la réaction catalysée par ThyX *Mtb* :



A cela, s'ajoute la réaction faisant intervenir le dioxygène. Nous discuterons les résultats en se basant sur le schéma suivant, résumant l'ensemble de ces réactions :

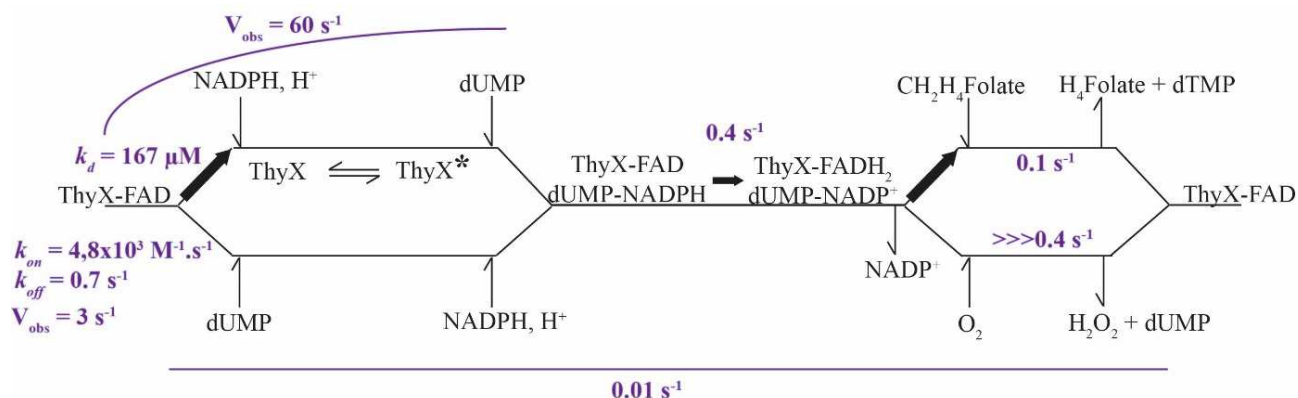


Figure 3-16 : Schéma général des réactions étudiées dans ThyX *Mtb*. Les valeurs expérimentales sont en violet. Les flèches en gras représentent le chemin privilégié cinétiquement, en fonction des conditions, issu des observations décrites dans la partie résultat.

3.3.1 Sélectivité du NADPH

Des études avaient déjà rapporté que les ThyX (issues de *Thermatoga maritima* et *PBCV-1*) oxydaient à la fois le NADH et le NADPH [71, 84, 93, 102, 113]. Il était alors difficile de soutenir qu'un de ces réducteurs était le substrat physiologique de ThyX. Nous avons par contre montré que ThyX *Mtb* présente une spécificité de substrat : seule le NADPH est oxydé par l'enzyme.

In vivo, les rapports NADPH/NADP⁺ et NADH/NAD⁺ sont régulés et maintenus à 10/1 et 1/3 respectivement dans *Mtb* [114]. Le NADPH est donc le réducteur majoritaire dans la bactérie, associé aux réactions anaboliques, tandis que le NAD⁺ est joué le rôle d'oxydant, associé aux réactions cataboliques. Ces

éléments sont en accord avec nos résultats qui suggèrent que le NADPH est le substrat physiologique de ThyX dans *Mtb*.

3.3.2 Contrôle du dUMP et du NADPH dans le site actif

Il a été montré qu'en absence de dUMP, le noyau isoalloxazine de la flavine était très flexible et la fixation du dUMP a pour effet de stabiliser une conformation de la flavine et la positionne pour une réduction efficace par le NADPH [90, 91]. De même que dans ThyX *PBCV-1*, le dUMP joue le rôle d'activateur pour cette première partie de la réaction dans ThyX *Mtb* et réoriente le FAD dans le site actif de ThyX (Fig. 3-17).

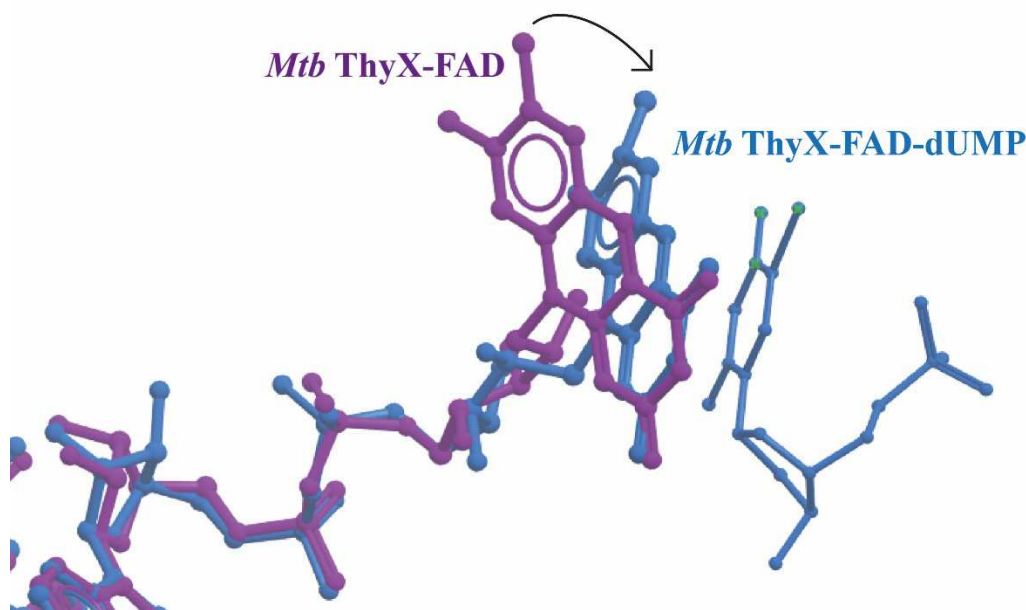


Figure 3-17 : Orientation du noyau isoalloxazine du FAD dans la structure de ThyX *Mtb* en présence (bleu, PDB : 2AF6) et en absence (violet, PDB : 3HZG) de dUMP. Image réalisée avec MolSoft.

Inversement, j'ai montré que la fixation du NADPH à l'enzyme améliorait d'un facteur 20 la vitesse de fixation du dUMP. Le k_d du dUMP est estimé à 160 μM pour ThyX-FAD de *Mtb*. tandis que son k_M est estimé à 20 μM . Cette

différence est sans doute due aux changements conformationnels du site actif qui font suite à la fixation du NADPH. Ces deux substrats peuvent se fixer sur l'enzyme oxydée de manière désordonnée *in vitro*, cependant l'ordre NADPH puis dUMP est plus favorisé cinétiquement (Fig. 3-16, 1^{ère} flèche en gras).

Cette modulation nous permet d'émettre de sérieux doute sur un désordre de fixation *in vivo*. La concentration en dUMP dans les bactéries est de l'ordre de 25 μM . Ainsi, il est possible que la fixation du NADPH régule celle du dUMP au site actif de ThyX dans la cellule : à forte concentration en dUMP, le dUMP se fixe peu à l'enzyme si la concentration en NADPH est faible. Réciproquement la fixation du dUMP conditionne le transfert d'hydrure du NADPH vers le FAD. Etant donné que la thymidine est le nucléotide qui différencie l'ADN de l'ARN, il est envisageable que cette réciprocité dans l'initiation de la réaction au site actif de ThyX *Mtb* participe à la régulation de la réplication de l'ADN : i) la concentration en NADPH reflétant l'état redox de la cellule, et ii) la concentration en dUMP traduisant le pool de nucléotides disponibles. Ces implications vont cependant au-delà du cadre de ma thèse.

3.3.3 Sortie du NADP⁺

Après le premier transfert d'hydrure (du NADPH vers le FAD), il est généralement accepté que le NADP⁺ est libéré (Fig. 3-16): d'abord car l'encombrement stérique au site actif est trop important pour la formation d'un complexe ThyX-FADH₂-dUMP-NADP⁺-CH₂H₄folate [93, 102, 118] ; ensuite

car beaucoup d'études mécanistiques, qui se concentrent sur la seconde partie de la réaction, utilisent le dithionite à la place du NADPH pour réduire l'enzyme, démontrant que le NADP⁺ n'est pas nécessaire au complexe enzymatique pour assurer l'activité de ThyX [87, 88, 110, 119].

Nous avons montré que l'inhibition de l'activité d'oxydation du NADPH par CH₂H₄Folate et du H₄Folate est incompétitive par rapport au NADPH. Conjointement avec le relargage du NADP⁺, cela suggère que le CH₂H₄folate manifeste une affinité accrue pour le complexe ThyX-FADH₂-dUMP.

3.3.4 Le transfert de carbone limite la réaction globale

La biodisponibilité de l'O₂ est amoindrie dans *Mtb* dans les conditions physiologiques [120]. De plus l'affinité du CH₂H₄folate pour le complexe ThyX-FADH₂-dUMP est accrue. Ainsi, la compétition entre les deux oxydants ira dans le sens du CH₂H₄folate et la synthèse de dTMP (Fig. 3-16, 3^{ème} flèche en gras) au détriment de l'activité NADPH oxydase dont le produit H₂O₂ peut avoir des effets toxiques dans la cellule [108, 121].

Cette seconde partie de la réaction avec le CH₂H₄folate implique le transfert de méthylène et la ré-oxydation de la flavine. La ré-oxydation de la flavine est particulièrement lente dans ThyX *Mtb* (0.1 s⁻¹), comparée aux autres ThyX (>1000 s⁻¹ pour ThyX *PBCV-1*). En prenant en compte la vitesse du premier transfert d'hydrure (0.4 s⁻¹) et la constante catalytique de ThyX *Mtb* pour la synthèse de dTMP (0.65 min⁻¹, ou 0.01 min⁻¹), nous pouvons voir

émerger un point commun essentiel entre ces ThyX : la réaction n'est pas limitée par les transferts d'hydrure et la chimie d'oxydo-réduction ; c'est donc le transfert de carbone qui limite la réaction globale (Fig. 3-16).

3.3.5 ThyX joue le rôle de thymidylate synthase dans *Mtb*

Dans *Mycobacterium tuberculosis*, il y a deux thymidylate synthases : ThyX et ThyA. Toutefois, Fivian-Hugues et al ont montré en 2012 que ThyX était nécessaire et suffisante et que la croissance d'une souche $\Delta thyA$ est identique à celle d'une souche sauvage dans des macrophages en culture ou dans un modèle murin [44]. Une voie de sauvetage par la thymidine kinase (qui permet de prélever de la thymidine du milieu) est absente dans *Mtb* [71]. ThyX peut donc assurer la synthèse de dTMP dans *Mtb*.

Le génome de *Mtb* fait 4.4 million de paires de bases avec 34.4% d'AT [11]. Pour un temps de génération de 24h et une constante catalytique de ThyX *Mtb* de 0.65 min^{-1} (*in vitro*), nous pouvons estimer à 1600 le nombre théorique de ThyX nécessaires pour assurer la croissance de la bactérie. Le volume de la bactérie mesuré en microscopie électronique est de $8.4 \mu\text{m}^3$ [122]. La concentration de ThyX *in vivo* devrait donc être de l'ordre de 300 nM. L'efficacité de ThyX *Mtb* semble limitée *in vitro*, mais cet ordre de grandeur paraît déjà acceptable. Etant donné la lenteur de croissance de la bactérie, son besoin en dTMP au cours du temps est plus faible et il apparaît qu'une enzyme telle que ThyX *Mtb* peut suffire à sa croissance. De plus, la surexpression

compensatoire de ThyX dans les souches multi- et ultra-résistantes de *Mtb* soutient cette hypothèse.

3.3.6 Une seconde fonction pour ThyX dans *Mtb* ?

Cela n'explique cependant pas pourquoi ThyX est essentielle dans *Mtb* en présence de ThyA, la seconde thymidylate synthase. L'activité de ThyA *Mtb* est supérieure à celle de ThyX *Mtb* (18 min^{-1} [101] et 0.65 min^{-1} respectivement), et l'activité de la DHFR de *Mtb* (138 min^{-1} , [123]) ne limite pas celle de ThyA. Fivian-Hughes et al proposent d'ailleurs que ThyX est bifonctionnelle dans *Mtb* [44].

Nous savons que ThyX a deux activités *in vitro* : thymidylate synthase et NADPH oxydase. Etant donné que la bactérie est soumise à un très grand stress oxydatif *in vivo* [124], il est séduisant de penser qu'elle pourrait également avoir une fonction de détoxification des ROS via son activité NADPH oxydase. Ulmer et al ont construit de nombreux mutants de ThyX *Mtb* et identifié au moins six mutants incapables de synthétiser le dTMP mais qui conservent l'activité d'oxydation du NADPH (Y44F, Y108S, V109E, R190A, F195V, R199A, [85]). Si l'insertion d'une de ces mutations sur le gène *thyX* dans une souche de *M. tuberculosis* portant toujours le gène *thyA* est viable, cela irait dans le sens d'une activité NADPH oxydase de ThyX essentielle.

Cependant, cette hypothèse est en contraste avec l'effet antimycobactérien du 5-Fluoro-uracile (5FU) qui implique l'inhibition de ThyX *Mtb* {Singh, 2015

#129}. En effet, le 5FU n'inhibe pas l'oxydation du NADPH par ThyX *Mtb*, et son mode d'action suggère une activité thymidylate synthase essentielle de ThyX dans *Mtb*.

3.3.7 Conclusion générale et perspectives :

Nous avons décortiqué dans cette partie le mécanisme de ThyX *Mtb* par spectroscopie résolue en temps. Nous avons montré la spécificité de substrat de ThyX *Mtb*, la manière dont le site actif contrôle la fixation du NADPH et du dUMP réciproquement, et tenté de remettre ces éléments dans un contexte physiologique.

La ré-oxydation de ThyX-FADH₂ par l'ajout de CH₂H₄folate est limitée *in vitro*. Il est évident à partir de nos résultats qu'une fraction de l'enzyme ne réagit pas ou peu. Dans la cellule, les folates sont polyglutamylés ce qui n'est pas le cas de nos substrats *in vitro*. Cette différence pourrait limiter l'activité de ThyX *Mtb in vitro*, comme l'avons constaté lors de la ré-oxydation de l'enzyme par l'addition de CH₂H₄folate (Fig. 3-8).

Dans ThyX *Mtb*, le dUMP fixé est totalement enfouie et inaccessible au solvant [89]. Or, aucun intermédiaire protéique de transfert du carbone n'a encore été identifié et il est supposé que le transfert de méthylène se fait directement du CH₂H₄folate vers le dUMP. Cette hypothèse est cependant en contraste avec la structure du CH₂H₄folate dans la ThyX de *Thermatoga maritima* où le noyau ptérine du folate (partie réactive) s'empile sur la flavine

dans la face opposée à celle du dUMP, configuration qui n'est pas favorable au transfert direct du méthylène [92]. Les mécanismes précis d'activation du dUMP et du transfert de carbone sont aujourd'hui inconnus et beaucoup d'hypothèses restent en discussion dans la littérature.

4. Chapitre IV - Mécanisme d'inhibition et Modèle pharmacophore de ThyX *Mtb*

Avant le début de cette thèse, des inhibiteurs de la ThyX de *Paramecium Bursaria chlorella virus*, avaient été identifiés [94]. Cette enzyme était utilisée comme modèle d'étude de ThyX en raison de sa facilité de production, purification, et mesure d'activité. Les molécules identifiées sont des 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones avec une molécule lead nommée C8C1. Basta et al. ont montré que les dérivés de 2-OH-1,4-Naphthoquinone étaient compétitifs du site de fixation du dUMP dans le site actif de ThyX. En d'autres termes, C8C1 se fixe à ThyX *PBCV-1* et prend la place du dUMP dans le site actif. Sans dUMP, l'activité de l'enzyme est bloquée. Cela a été montré par des tests enzymatiques (voir 4.1 Les différents types d'inhibition) et par co-cristallisation (Fig. 4-1).

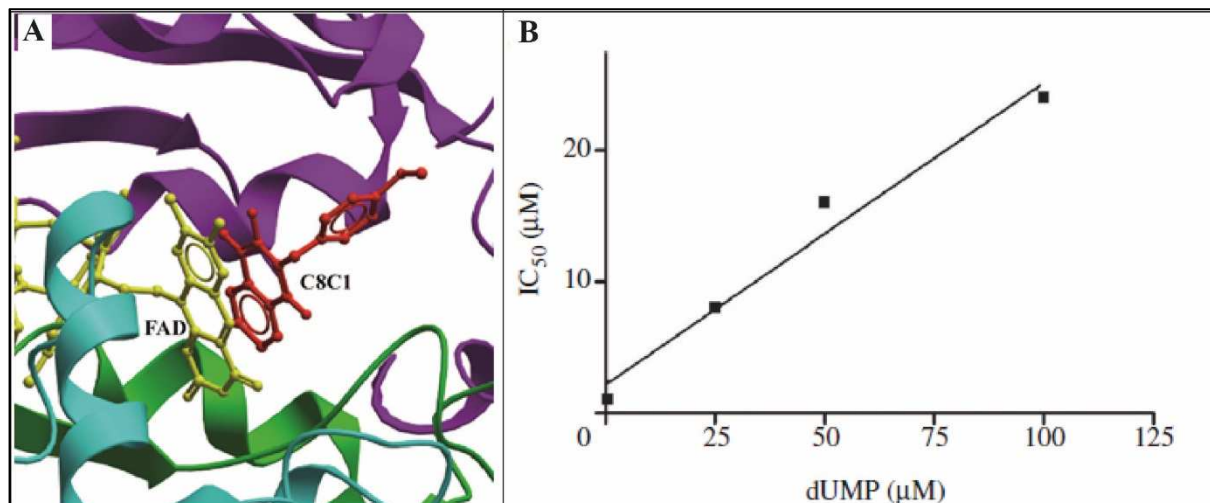


Figure 4-1 : C8C1 est un inhibiteur compétitif du dUMP dans ThyX *PBCV-1*. A) Empilement de C8C1 sur le noyau isoalloxazine de la flavine dans le site actif de ThyX *PBCV-1* (code PDB : 4FZB). B) IC₅₀ de C8C1 sur ThyX *PBCV-1* en fonction de la concentration en dUMP démontrant un type d'inhibition compétitif. (D'après Basta et al. Open Biology. 2012).

Ces études ont été le point de départ de mes travaux sur l'inhibition de la thymidylate synthase ThyX de *Mycobacterium tuberculosis*.

Nous ferons dans un premier temps un rappel théorique sur les différents types d'inhibition et leurs méthodes de détermination. Dans un second temps, nous étudierons les modalités de l'inhibition de ThyX *Mtb* par les naphthoquinones. Enfin, nous aborderons la démarche employée pour identifier de nouveaux inhibiteurs de ThyX *Mtb* qui pourraient avoir un effet antimycobactérien.

4.1 Rappel théorique : Les différents types d'inhibition

Une enzyme est une protéine qui catalyse une réaction chimique en abaissant l'énergie d'activation de cette dernière. Un inhibiteur a une affinité pour l'enzyme seule et/ou en complexe avec un ou plusieurs substrats et sa fixation a pour effet de bloquer la réaction. Il nous est possible de poser le schéma théorique suivant :

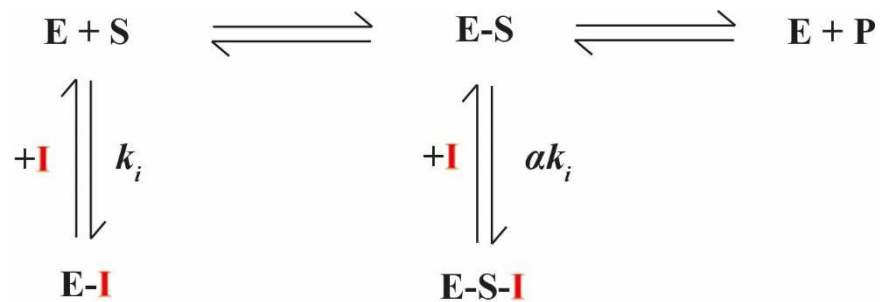


Figure 4-2 : Schéma globale d'inhibition de l'activité d'une enzyme. K_i est la constante d'inhibition de la molécule. α est le coefficient qui modulent le k_i en fonction de la forme d'enzyme, S : substrat, P : Produit, I : Inhibiteur, E : Enzyme, E-S : complexe enzyme-substrat.

Nous pouvons distinguer trois types d'inhibition : compétitive, incompétitive et non-compétitive.

L'inhibition compétitive implique la compétition entre l'inhibiteur et un substrat pour le site actif, la fixation de l'un prévenant ou gênant la fixation de l'autre. En général, cela suggère une affinité de l'inhibiteur pour un site au moins partiellement en chevauchement avec le site de fixation du substrat. Dans le schéma, figure 4-2, un inhibiteur compétitif de la fixation du dUMP aurait un $\alpha \gg 1$, l'affinité de la molécule étant plus grande en absence de substrat.

L'inhibition incompétitive implique au contraire la fixation de l'inhibiteur préférentiellement au complexe enzyme-substrat. Cela suggère des changements

dans la structure du site actif après la fixation du substrat qui augmenteraient l'affinité de la molécule pour le complexe. En d'autres termes, $\alpha \ll 1$, et αk_i sera la constante d'inhibition, c'est-à-dire la constante qui rend compte de l'affinité réelle de l'inhibiteur pour l'enzyme pendant la réaction.

Enfin, l'inhibition non-compétitive implique une affinité de l'inhibiteur similaire sur l'enzyme seule ou en complexe avec un substrat. Dans ce cas, $\alpha = 1$.

Distinguer ces trois types d'inhibition revient à observer l'effet de la concentration de substrat sur l'inhibition de l'activité de l'enzyme. Classiquement, l'inhibition est mesurée sous forme d' IC_{50} . L' IC_{50} est la concentration d'inhibiteur pour laquelle 50% de l'activité de l'enzyme (et donc des enzymes) est inhibée. Le cas général est décrit par l'équation (16) de l'inhibition non-compétitive :

$$IC_{50} = \frac{[S] + k_m}{\frac{k_m}{k_i} + \frac{[S]}{\alpha k_i}} + \frac{[E]}{2} \quad (16)$$

et les types compétitif et incompétitif en découlent pour des valeurs extrêmes du facteur α (0 et ∞) :

Tableau 4 : Calcul de la constante d'inhibition en fonction du mode d'inhibition d'une molécule

Compétitif	$\alpha \gg \gg 1$	$IC_{50} = k_i \left(1 + \frac{[S]}{k_m} \right) + \frac{[E]}{2}$	(17)
Incompétitif	$\alpha \ll \ll 1$	$IC_{50} = \alpha k_i \left(1 + \frac{k_m}{[S]} \right) + \frac{[E]}{2}$	(18)
Non-Compétitif	$\alpha = 1$	$IC_{50} = k_i + \frac{[E]}{2}$	(19)

Graphiquement, nous pouvons observer le type d'inhibition en traçant

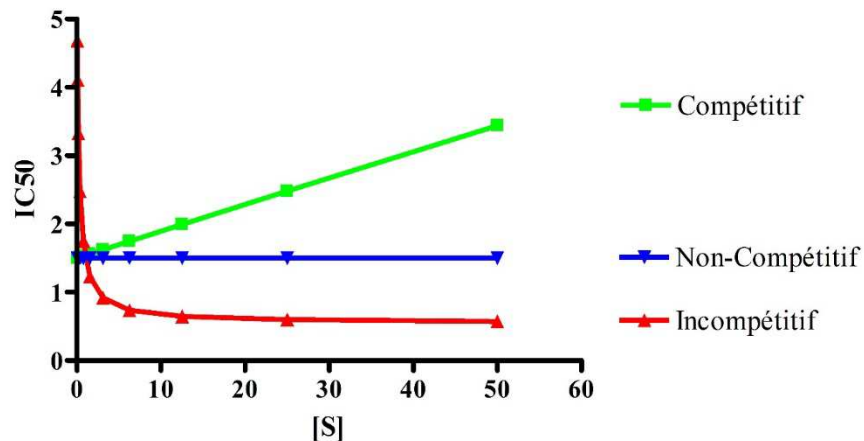


Figure 4-3 : IC₅₀ en fonction de la concentration en substrat. Simulation pour des valeurs de α de 100, 1 et 0.01. K_m est fixé à 25 et E à 1.

l'IC₅₀ en fonction de la concentration en substrat (Fig. 4-3).

Pour déterminer le mode d'inhibition des inhibiteurs, je mesurerais l'IC₅₀ en fonction de la concentration en substrat, et le mode d'inhibition sera déduit du profil obtenu en fonction de la concentration en substrat (Fig. 4-3).

4.2 Résultats :

Nous avons commencé par la synthèse de 18 variants de C8C1. Tous portent des groupements différents en position 2 (OH ou Cl) et 3 du noyau naphthoquinone :

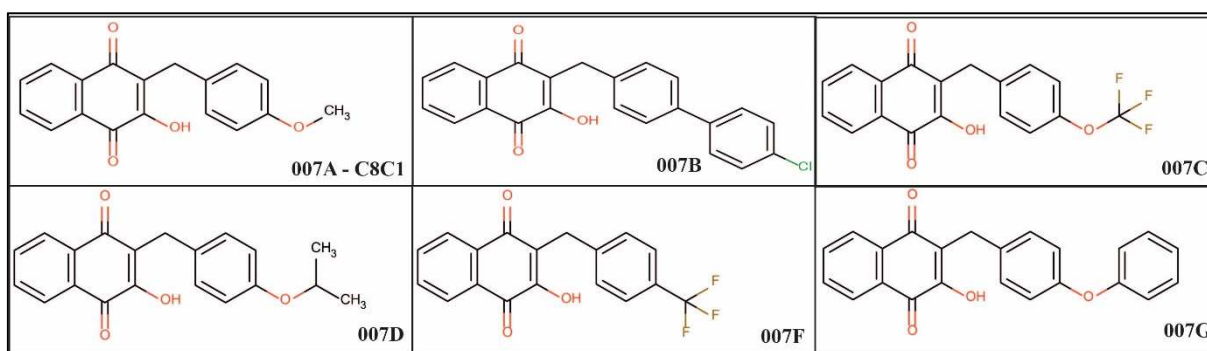


Figure 4-4 : C8C1 et autres dérivés de 2-OH-1,4-Naphthoquinone

Le test de ces molécules sur l'activité de ThyX *Mtb* a révélé que le mode d'action de ces molécules était différent de celui observé sur ThyX *PBCV-1*:

4.2.1 Effet des 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones sur ThyX *Mtb*

Nous avons d'abord mesuré l'inhibition des molécules présentées dans la figure 4-4 sur l'activité d'oxydation du NADPH de ThyX *Mtb*. Dans ce cas, le test est fait en absence de CH_2H_4 folate et nous observons uniquement l'activité d'oxydation du NADPH en présence de dUMP, c'est-à-dire la première partie de la réaction.

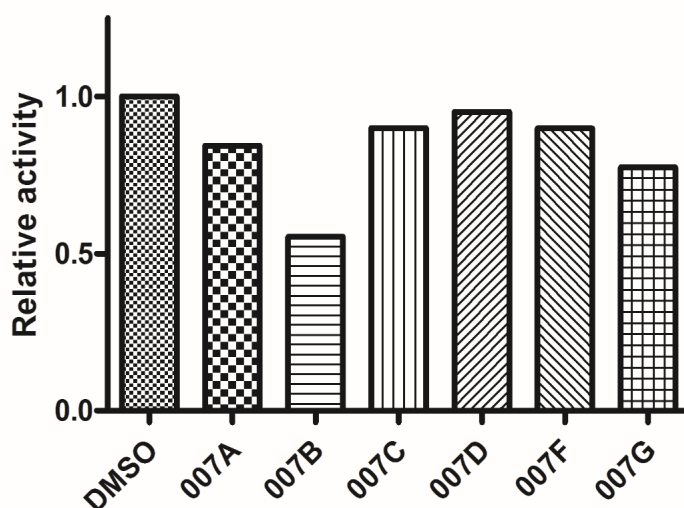


Figure 4-5 : Activité relative d'oxydation du NADPH de 10 μM de ThyX *Mtb* en présence de 100 μM de différentes 2-OH-1,4-Naphthoquinones dans 1% DMSO. La normalisation est faite sur l'activité mesurée en présence de 1% DMSO en absence de naphthoquinones.

Nous pouvons voir dans la figure 4-5, les 2-OH-1,4-Naphthoquinones, testées à 100 μM , n'inhibent pas l'activité d'oxydation du NADPH de ThyX *Mtb*. Cela se distingue déjà du mode d'action de ces molécules dans ThyX *PBCV-1* où, en empêchant le dUMP de se fixer à l'enzyme, par compétition au site actif de l'enzyme, nous observons une inhibition de l'oxydation du NADPH [94].

Dans un second temps, nous avons testé ces mêmes molécules en test de déprotonation, car si l'inhibition de la première partie de la réaction induit l'inhibition de la seconde, l'absence d'inhibition de l'oxydation du NADPH ne traduit pas une inhibition (ou pas) de l'activité de synthèse de dTMP par ThyX *Mtb*.

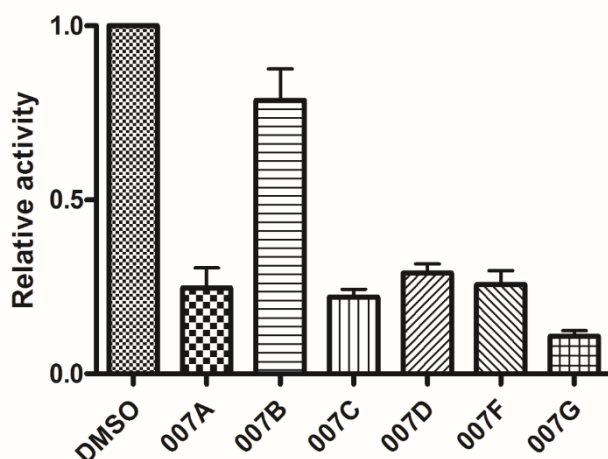


Figure 4-6 : Activité relative de synthèse de dTMP de 1 μ M de ThyX *Mtb* en présence de 100 μ M de différentes 2-OH-1,4-Naphthoquinones dans 1% DMSO. La normalisation est faite sur 1% DMSO en absence de naphthoquinones.

Contrairement à ce qui était observé sur le test d'oxydation du NADPH, nous observons une inhibition modérée de l'activité de synthèse de dTMP (Fig. 4-6). Cela implique deux choses : i) ces molécules ne sont pas optimisées pour la ThyX de *Mycobacterium tuberculosis* et ii) le mode d'inhibition est différent de celui observé sur les autres ThyX (ThyX *PBCV-1*, [94]; ThyX *Helicobacter pylori*, [76]).

4.2.2 Les 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones ne ciblent pas le site de fixation du dUMP dans ThyX *Mtb*

Nous nous sommes intéressés au mode d'inhibition de ces molécules sur ThyX *Mtb*, en prenant comme cas d'étude C8C1, molécule lead pour l'inhibition de ThyX *PBCV-1* avec une constante d'inhibition de 300nM. C8C1 est un inhibiteur compétitif du dUMP dans ThyX *PBCV-1*. Afin de caractériser son mode d'inhibition de ThyX *Mtb*, nous avons croisé une gamme de substrat et

une gamme d'inhibiteur, et mesuré l'effet sur l'activité de synthèse de dTMP de l'enzyme :

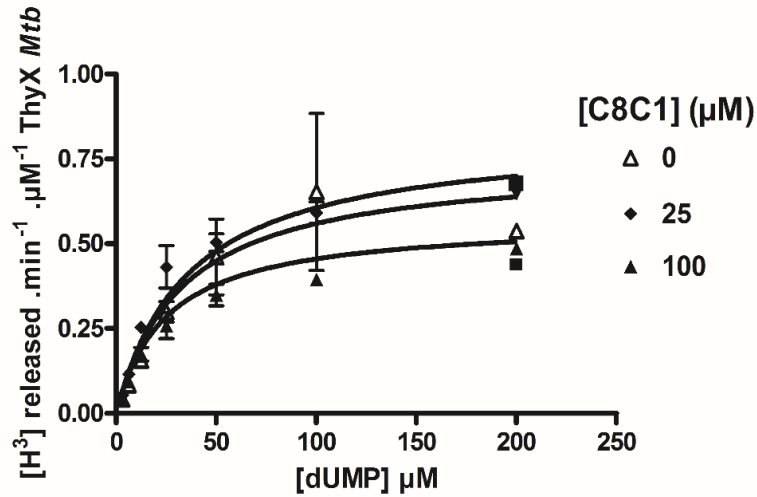
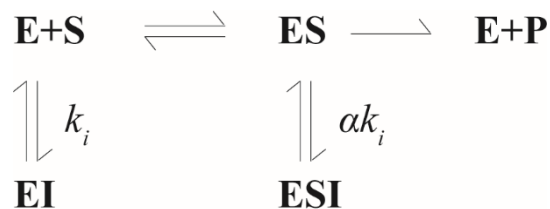


Figure 4-7 : Mode d'inhibition de C8C1 sur ThyX *Mtb*. L'activité de 1µM de ThyX a été mesurée en présence de 1mM NADPH et 250µM de CH₂H₄Folate. Le dUMP est titré (200µM ; 100µM ; 50µM ; 25µM ; 12.5µM ; 6.25µM ; 3.125µM) en fonction de la concentration en C8C1 (0µM ; 25µM ; 100µM).

La gamme d'inhibiteurs ne permet pas d'estimer un IC₅₀ et de déterminer graphiquement le mode d'inhibition comme expliqué dans le rappel 4.1. Par conséquent, l'ajustement présenté dans la figure 4-7 correspond au modèle global d'inhibition suivant le schéma :



Avec :

$$v = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}} * \frac{[S]}{K_m * \frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}} + [S]} \quad (20)$$

Où S est la concentration en substrat (dUMP), [I] est la concentration en inhibiteur (C8C1), Vmax la vitesse maximale de l'enzyme, v la vitesse mesurée, et, Ki et αKi les constantes d'inhibition, où α nous renseigne sur le mode d'inhibition.

Les données s'ajustent à l'équation (20) avec un coefficient de corrélation de 0.87, et nous donne une constante d'inhibition de 220μM pour un mode d'inhibition incompétitif du dUMP sur ThyX *Mtb*. En d'autres termes, C8C1 présente une meilleure affinité pour le complexe *Mtb* ThyX-dUMP. Il semble que ces molécules ne ciblent pas le site de fixation du dUMP dans l'enzyme, résultat qui a été très surprenant.

Nous avons confirmé cela spectralement : la fixation du dUMP au site actif de ThyX provoque un changement spectral de la flavine, facilement mesurable. Inversement, nous pouvons mesurer la sortie du dUMP du site actif par le changement spectral inverse. Nous avons donc tenté d'observer la sortie du dUMP du site actif de ThyX *Mtb* et *PBCV-1*, en fonction de la concentration en C8C1.

Nous travaillons ici sur l'enzyme sous forme oxydée. Afin de nous trouver dans des conditions d'excès de dUMP, mais pas à saturation nous avons

commencé par une gamme de ce substrat pour les deux enzymes, ThyX *Mtb* et ThyX *PBCV-1* et nous avons mesuré l'entrée du dUMP dans le site actif.

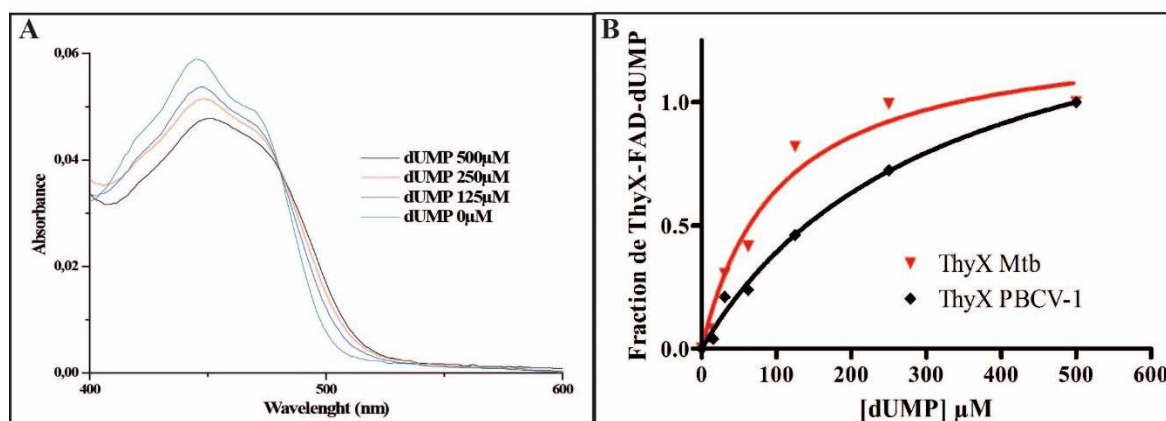


Figure 4-8 : Courbes de saturation de ThyX *PBCV-1* et de ThyX *Mtb* par le dUMP. 50 μM de ThyX FAD sont mis en présence de concentrations croissantes de dUMP (0 μM ; 31,25 μM ; 62,5 μM ; 125 μM ; 250 μM ; 500 μM) mesuré par spectrophotométrie. La pente du spectre est extraite entre 485 et 505 nm, et on déduit de cette pente la fraction de FAD ayant fixé du dUMP. La normalisation est réalisée pour le maximum observé de FAD ayant fixé du dUMP. A) Spectres de la flavine dans ThyX *Mtb* pour différentes concentrations de dUMP ajoutées. B) Saturation de ThyX *Mtb* et de ThyX *PBCV-1* par le dUMP.

Nous pouvons voir dans la figure 4-8.A, les spectres de la flavine dans ThyX *Mtb*, en présence de différentes concentrations de dUMP. Afin de disposer d'un meilleur rapport signal/bruit, nous avons mesuré le changement spectral en calculant la pente du spectre entre 485 et 505 nm (moyennant ainsi l'effet du dUMP sur plusieurs points du spectre). Cela nous a permis d'estimer la fraction de flavine ayant fixé le dUMP, par rapport la même fraction à l'équilibre (Fig. 4-8.B).

Après avoir estimé l'excès de dUMP (150 μ M pour ThyX *Mtb* et 500 μ M pour ThyX *PBCV-1*, figure 4-8.B), et avons réalisé une gamme de concentration C8C1. En corrigeant les spectres pour la contribution de C8C1, nous avons pu mesurer la fraction de flavine en interaction avec le dUMP dans le site actif en fonction de la concentration en C8C1 :

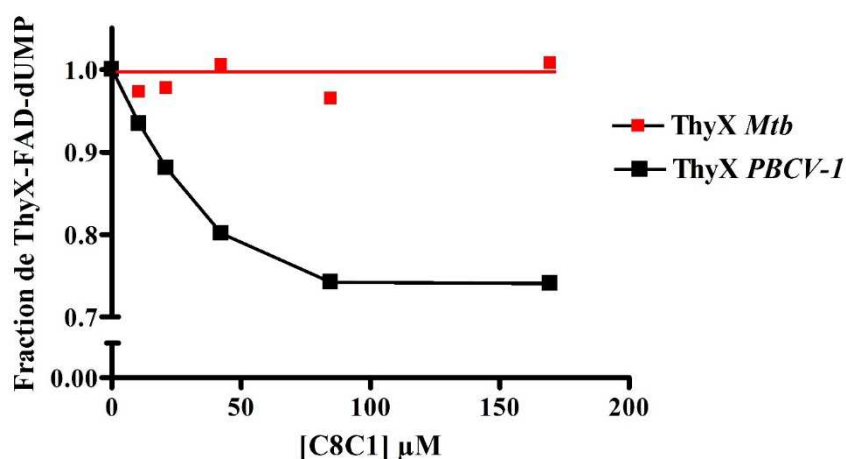


Figure 4-9 : Mesures de la fraction de FAD ayant du dUMP fixé au site actif de ThyX en fonction de la concentration de C8C1. Les spectres sont mesurés pour les différentes concentrations de C8C1 avec ou sans ThyX, ce qui permet d'extraire les spectres correspondant au FAD dans les différentes conditions. La pente entre 485 et 505 nm est extraites pour mesurer la fixation de dUMP. La normalisation est réalisée pour 0 μ M de C8C1.

Nous pouvons voir dans la figure 4-9 que la fixation du dUMP dans ThyX *Mtb* ne dépend pas de la concentration en C8C1, contrairement à son homologue ThyX *PBCV-1* dans laquelle nous pouvons effectivement voir la sortie du dUMP en fonction de la concentration en C8C1. Cela confirme que C8C1 n'est pas compétitif du dUMP dans ThyX *Mtb*, en accord avec nos précédentes

observations. La question du mode d'inhibition de C8C1 sur l'activité de ThyX *Mtb* se pose donc encore.

4.2.3 Activité d'oxydo-réduction des naphthoquinones

En présence de CH₂H₄Folate, la vitesse d'oxydation du NADPH par ThyX *Mtb* est réduite car la réaction qui fait intervenir uniquement l'O₂ est plus rapide. Or en présence de CH₂H₄Folate, les 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones telles que C8C1 ont l'effet inverse, et activent l'oxydation du NADPH :

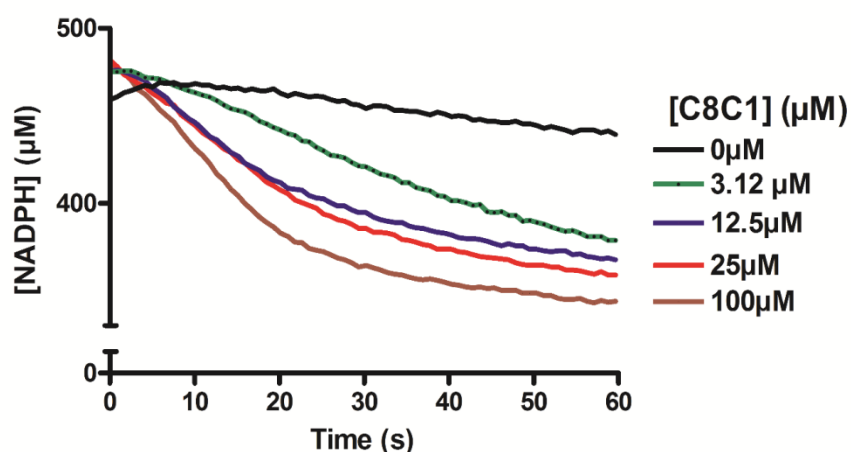


Figure 4-10 : Activité d'oxydation du NADPH (mesurée à 340nm) par ThyX *Mtb* en présence de CH₂H₄Folate et de différentes concentrations de C8C1 (0µM ; 3,125µM ; 12,5µM ; 25µM ; 100µM).

Dans la figure 4-10, nous pouvons voir que la vitesse d'oxydation du NADPH augmente en fonction de la concentration en C8C1.

L'activation de l'oxydation du NADPH peut être faite de deux manières : option 1) les molécules empêchent le CH₂H₄folate de se fixer, favorisant ainsi la ré-oxydation de l'enzyme par le dioxygène ; ou option 2) ces molécules sont

capables de ré-oxyder la flavine réduite, court-circuitant ainsi la réaction vers l'étape initiale. Cette seconde option suggère que C8C1 peut-être présent sous forme réduite ou oxydée, ce que nous avons testé.

Nous avons pu vérifier que C8C1 avait effectivement une forme oxydée, dont le spectre d'absorbance présente un pic à 480nm, et une forme réduite, obtenue en présence de dithionite (réducteur, -660mV), en conditions anaérobies, et son spectre n'absorbe pas dans le visible :

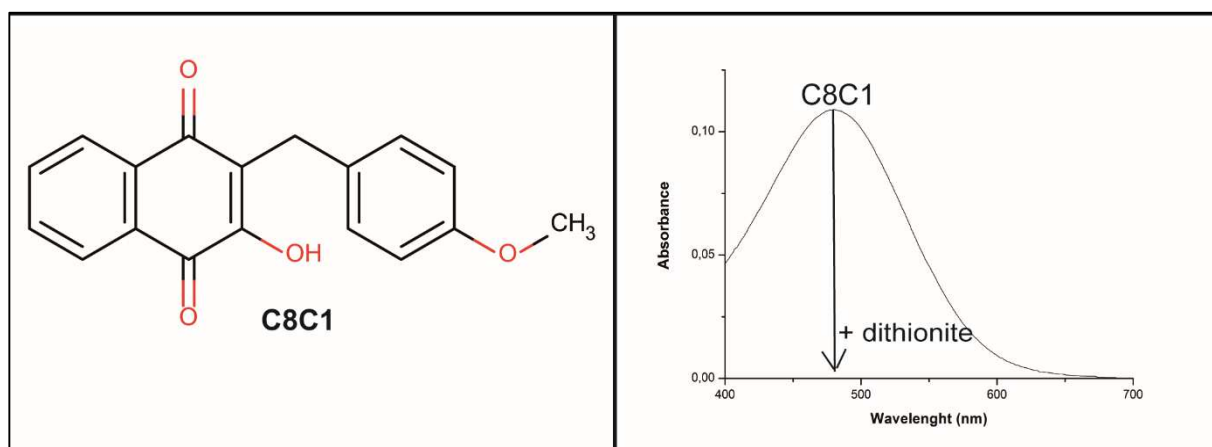


Figure 4-11 : A) structure de C8C1. B) Spectres d'absorbance de C8C1 sous forme oxydée (pic 480 nm) et réduite (n'absorbe pas dans le visible) obtenues en présence de dithionite en conditions anaérobies.

Le changement spectral de C8C1 (Fig. 4-11.A) selon son état oxydé ou réduit (Fig. 4-11.B) nous a permis par spectroscopie d'observer que l'inhibition de ThyX *Mtb* fait intervenir la forme réduite de C8C1 en conditions anaérobies. J'ai donc mesuré la ré-oxydation de la flavine par C8C1 en cinétique rapide (stopped-flow). Comme montré dans le schéma (Fig. 4-12), Nous avons fait varier la concentration de C8C1 et nous avons pu observer l'oxydation de la flavine dans l'enzyme pré-réduite en conditions anaérobies.

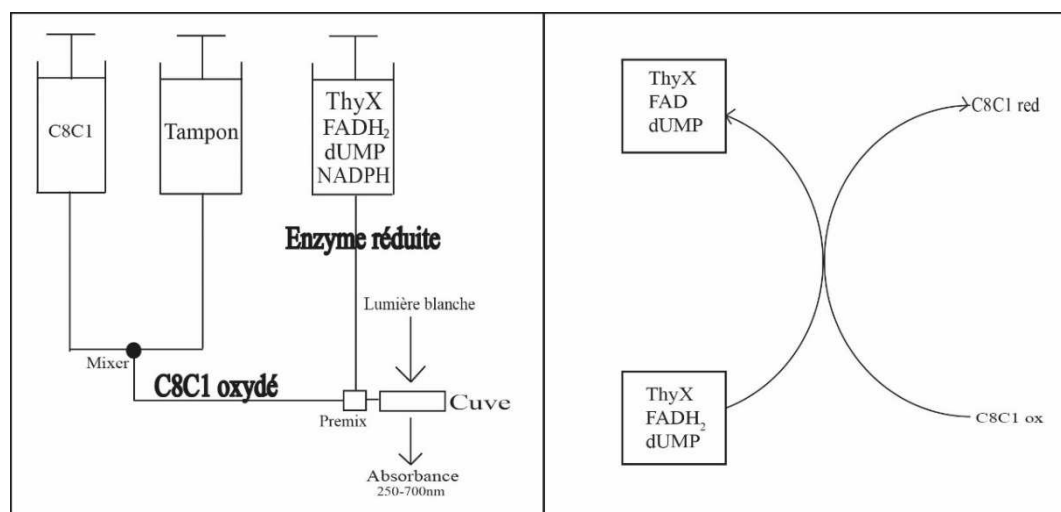


Figure 4-12 : Schéma du stopped flow mis en place. Nous augmentons progressivement la concentration de C8C1 sous forme oxydé sur un mélange constant d'enzyme pré-réduite par le NADPH en présence de dUMP en conditions anaérobies.

Les spectres de C8C1 et du FAD se chevauchent jusqu'à 515 nm environ. Nous avons extrait la cinétique à 530 nm qui rend donc compte de la concentration de C8C1 sous forme oxydée en fonction du temps. Nous avons ensuite corrigé cette cinétique pour les coefficients d'extinction molaire de C8C1 à 450 nm et 530 nm, et avons ainsi déduis la cinétique de C8C1 à 450 nm.

Enfin, nous avons soustrait cette cinétique (C8C1 à 450 nm) à la cinétique mesurée. Cette manipulation nous a permis d'extraire la cinétique de ré-oxdation de la flavine par la molécule C8C1 (Fig. 4-13.B) pendant l'expérience.

Cette expérience a été réalisée indépendamment sur les deux ThyX (ThyX *PBCV-1* et ThyX *Mtb*).

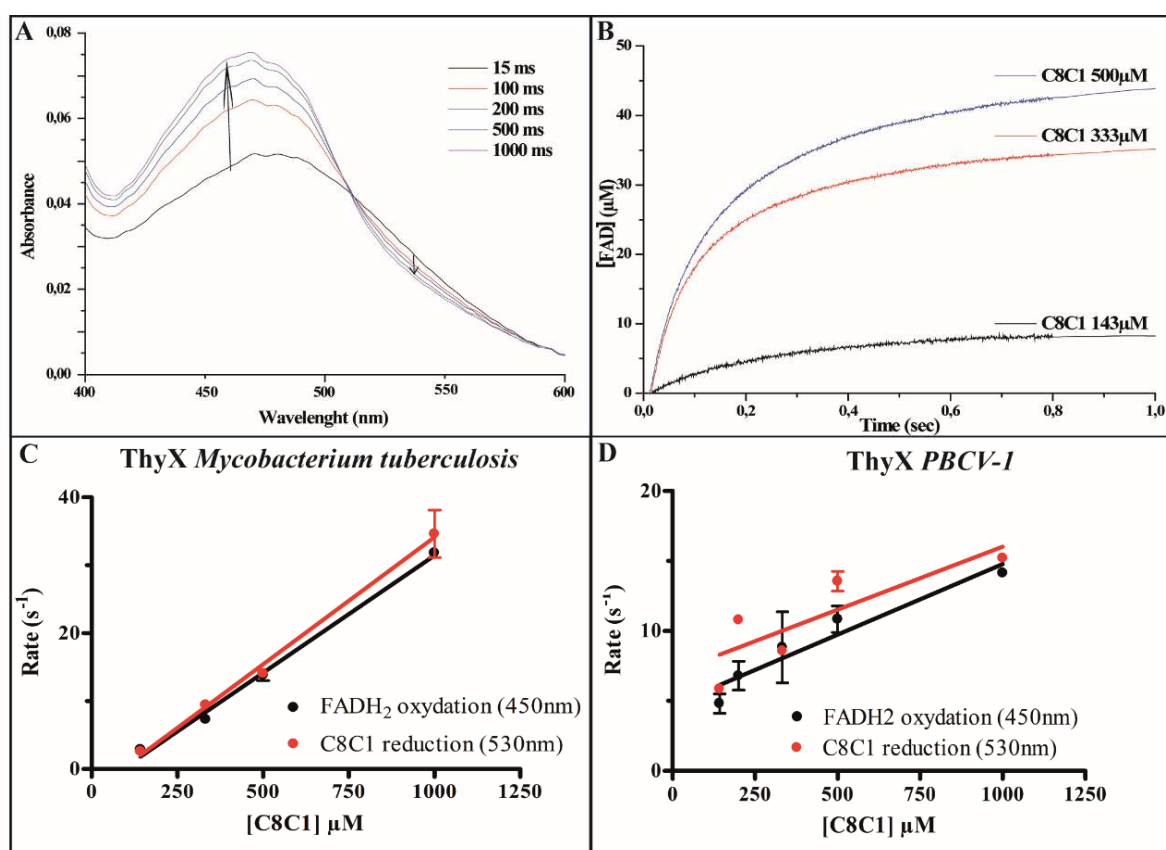


Figure 4-13 : Ré-oxdation du FADH₂ par C8C1 dans ThyX *Mtb* et dans ThyX *PBCV-1*. 50 μM de ThyX-FAD (500 μM de ThyX), préincubé avec 500 μM de dUMP et 500 μM de NADPH en conditions anaérobies, afin de disposer de l'enzyme pré-réduite, est mélangé avec une concentration croissante de C8C1 préparé également en conditions anaérobies. A) spectre de la flavine dans ThyX *Mtb* et de C8C1 (500 μM) mesurés à plusieurs temps après le mélange. B) Cinétique de ré-oxdation de la flavine, extraites de la cinétique à 450 nm ont été extraites, et la contribution de C8C1 a été soustraite des cinétiques. C) Vitesse d'oxydation de la flavine dans ThyX *Mtb* mesurée pour les cinétiques présentées dans la figure B, en fonction de la concentration de C8C1. D) Vitesse d'oxydation de la flavine dans ThyX *PBCV-1* mesurée de la même manière que dans la figure C, en fonction de la concentration en C8C1.

La ré-oxydation des flavines par C8C1 est de même ordre de grandeur dans ThyX *PBCV-1* et *Mtb*, avec des vitesses de 15 et 35 s⁻¹ respectivement, à 1mM de C8C1 (Fig. 4-13. C et D). Un bilan des résultats obtenus pour l'inhibition des deux ThyX par C8C1 est présenté tableau 5.

Tableau 5 : Bilan des résultats obtenus pour l'inhibition de ThyX *Mtb* et ThyX *PBCV-1* par C8C1.

	ThyX <i>Mtb</i>	ThyX <i>PBCV-1</i>
Vitesse de réoxydation de la flavine à 1mM de C8C1	35 s ⁻¹	15 s ⁻¹
K_i	220 μM	300 nM [94]
Inhibition par rapport au dUMP	Incompétitif	Compétitif [94]

C8C1 réoxyde la flavine dans les deux ThyX avec des vitesses similaires tandis que le K_i de C8C1 varie de 3 ordres de grandeur pour ces enzymes (Tableau 5). Un bon oxydant de ThyX-FADH₂ n'est donc pas un bon inhibiteur de ThyX. Cela montre que pour les inhibiteurs de ThyX, ne sont pas sélectionnés en fonction de leur réactivité d'oxydoréduction, cette propriété pouvant se montrer dangereuse *in vivo*. De plus, C8C1 présente un mode d'inhibition différent sur ThyX *PBCV-1* et *Mtb*, pour lesquels l'inhibiteur se fixe préférentiellement à l'enzyme seule et en complexe avec le dUMP respectivement (Tableau 5). Cela suggère qu'il existe un autre site de fixation

des naphthoquinones sur ThyX *Mtb*, et la fixation des molécules à ce site provoque l'inhibition observée de l'activité de l'enzyme.

Notre but est de développer des inhibiteurs de ThyX *Mtb* susceptibles d'avoir un effet antimycobactérien. Les 1,4-naphthoquinones présentent déjà un effet sur l'activité de ThyX *Mtb* et nous avons décidé de réaliser un nouveau crible afin d'identifier rapidement des 1,4-naphthoquinones capables d'inhiber plus efficacement l'enzyme.

Il paraît donc pertinent de cribler à nouveau des 1,4-Naphthoquinones afin d'identifier rapidement des variants capables d'inhiber efficacement l'activité de ThyX *Mtb*.

4.2.4 Sélection des molécules

Nous sommes dans le cadre d'une approche target-to-drug dans laquelle ThyX a été validée comme cible pertinente dans *Mtb*, et les naphthoquinones identifiées comme inhibiteurs de ThyX. Notre but ici sera de fonctionnaliser le squelette naphthoquinone par la substitution de différents groupements aux propriétés physicochimiques diverse (polaires, hydrophobe, etc) afin d'améliorer le pouvoir inhibiteur des dérivés naphthoquinone sur ThyX *Mtb*. Je caractériserai l'inhibition des de ThyX *Mtb* pour les molécules les plus prometteurs et je testerai ensuite leur pouvoir antimycobactérien sur *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*). *M. smegmatis* est utilisée comme

modèle car il s'agit d'une mycobactérie non pathogène, à croissance rapide que nous pouvons manipuler au laboratoire.

Afin d'obtenir une collection de dérivés naphthoquinone substituées d'une diversité de groupements, nous avons réalisé des recherches par similarité de structure au cœur naphthoquinone.

Après avoir considéré plusieurs vendeurs, nous avons sélectionné Chembridge (www.hit2lead.com) en raison de leur grande banque de molécules à prix compétitif.

Il est important de noter que les molécules de type naphthoquinone disponibles présentent pour la grande majorité d'entre elles uniquement des modifications sur le carbone 3 (R2, Fig. 4-14) ce qui limite les structures chimiques que nous pouvons considérer.

Nous avons vu dans l'introduction (1.10) qu'une des difficultés dans une stratégie target-to-drug était de convertir une efficacité *in vitro* (IC₅₀) en une efficacité *in vivo*, c'est-à-dire sur la bactérie dans son ensemble (MIC). Pour qu'une molécule puisse avoir un effet *in vivo* sur sa cible, il est important de prendre en compte ses propriétés physico-chimique (hydrophobicité, polarité, taille, nombre de donneur et d'accepteur de liaison hydrogène) afin qu'elle soit biodisponible.

Ces propriétés ont été énoncées par Christopher Lipinski et al [125], c'est la « règle de cinq ». Elle nous explique que la majorité (90-95%) des molécules biodisponibles présenterait des caractéristiques communes :

- Poids moléculaire < 500 Da
- $\log P < 5$
- Moins de 5 donneurs de liaison hydrogène
- Moins de 10 accepteur de liaison hydrogène

Le $\log P$ est une mesure de l'hydrophobicité/hydrophilicité d'une molécule. La molécule est dissoute dans un mélange eau/octanol, puis sa concentration est mesurée dans chacune des phases. Enfin le $\log P$ est calculé selon la formule : $\log P = \log \frac{[octanol]}{[eau]}$. Aujourd'hui, le $\log P$ est prédite à partir de la structure de la molécule (noté clogP pour computational $\log P$).

Si nous voulons sélectionner des molécules qui ont de meilleures chances d'avoir un effet *in vivo*, il nous faut respecter ces critères. Cependant, nous n'avons appliqué ces « règles » qu'à titre de ligne directrice car, comme mentionné dans la référence [125], les antibiotiques constituent une exception à la règle de cinq. Cela est probablement dû au fait que les propriétés physicochimiques qui permettent à une molécule de diffuser à travers la membrane d'une cellule eucaryote ne sont pas les mêmes que celles nécessaire pour traverser également l'enveloppe et la membrane bactérienne.

La recherche par similarité de structure (70%) au cœur naphthoquinone a sélectionné plus de 255 molécules et nous en avons choisi 88 en fonction de la règle de 5 et de la diversité des groupements ajoutés.

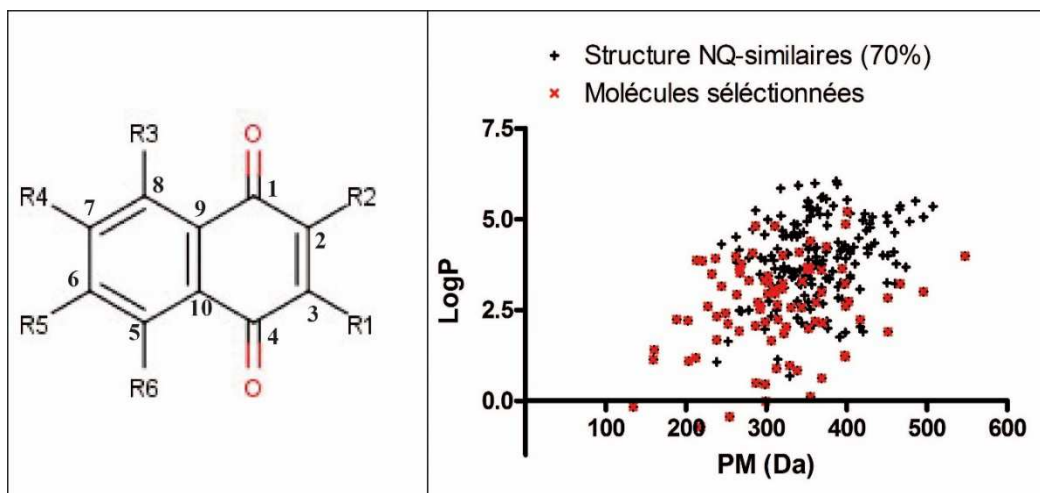


Figure 4-14 : Recherche par similarité de structure aux naphthoquinones et sélection des molécules à tester contre ThyX *Mtb* *in vitro*.

D'autres molécules ont été ajoutées à cette sélection :

Nous avons entamé une collaboration avec le Dr Sean Ekins (Burlingame, CA, USA) de Collaborative Drug Discovery (CDD) qui a construit une base de données de molécules active sur *Mtb* en culture à partir des nombreuses données de criblage phénotypique publiées dans la littérature [126]. Nous avons ainsi pu inclure 4 naphthoquinones déjà identifiées comme inhibiteurs de croissance de *Mtb* en culture mais de cible inconnue.

En collaboration avec le Pr. Maxwell (John Innes Centre, Norwich, UK), nous avons pu mettre en évidence que certaines naphthoquinones étaient capable d'inhiber à la fois la ThyX et l'ADN gyrase de *Mycobacterium tuberculosis*. 4

inhibiteurs naphthoquinone de *Mtb* ADN Gyrase ont été ajoutées à notre sélection (Djaout et al. page 178).

En résumé, les molécules ont été sélectionnées en fonction de leur i) similarité de structure au cœur naphthoquinone, ii) de leur activité contre l'ADN gyrase de *Mtb* ou ii) de leur activité contre *Mycobacterium tuberculosis* en culture. Une fois les molécules disponibles, je les ai testées pour l'inhibition de ThyX *Mtb in vitro*.

4.2.5 Criblage

Nous avons établi que ThyX-FADH₂-dUMP pouvait être réoxydés 1) par l'ajout de CH₂H₄folate pour produire du dTMP, 2) par l'O₂ pour produire du H₂O₂, ou enfin, 3) par une naphthoquinone pour produire une hydroquinone. Par conséquent, mesurer une consommation de NADPH ne peut rendre compte de l'activité de synthèse du dTMP par ThyX *Mtb* ou de son inhibition. C'est pourquoi les criblages se sont fait entièrement en mesurant la déprotonation du [5H³]dUMP par ThyX *Mtb*.

Les tests d'activités ont été réalisés avec 2 μM d'enzyme en présence de 100 μM de molécule. Afin de s'assurer que l'inhibition est spécifique, les mesures d'activités ont été réalisées en présence de 200 μg/ml de BSA.

Les résultats exhaustifs du crible sont montrés dans le tableau en annexe 2 (structure, propriétés des molécules, pourcentage d'inhibition). Je présente ici les résultats condensés :

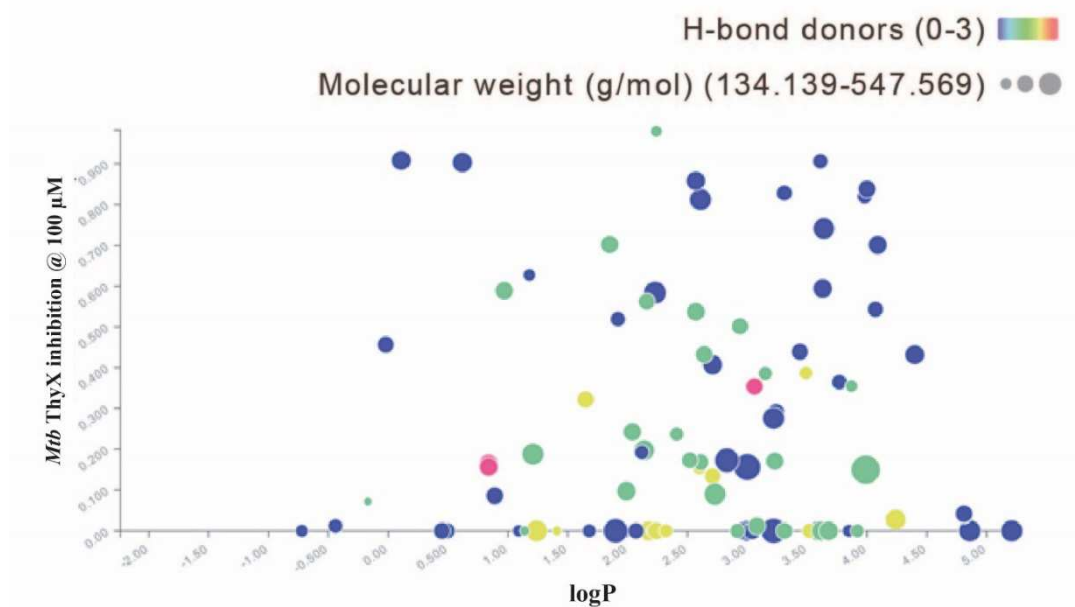


Figure 4-15 : Résultats du crible des molécules sélectionnées sur l'activité de ThyX *Mtb*. La réaction inclue 1 mM NADPH, 500 µM CH₂H₄folate, 5 µM dUMP, 2 µM ThyX *Mtb*, 500 µM FAD, 200 µg/ml de BSA et 100 µM de molécule (1% DMSO final). Le test a été réalisé 2 fois sur l'ensemble des molécules présentées. Bleu, vert, jaune, rouge : respectivement 0, 1, 2, 3 donneurs de liaison hydrogène. La taille des points est relative à la taille des molécules. L'inhibition a été normalisée en fonction du contrôle en absence de molécule : 1 signifie 100% d'inhibition.

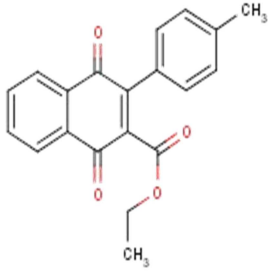
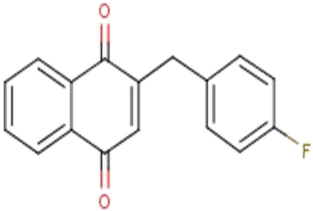
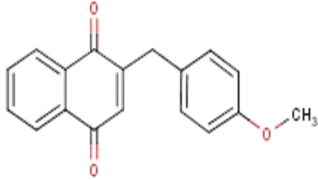
Nous ne pouvons voir aucune corrélation évidente entre la taille, l'hydrophobicité et le pouvoir inhibiteur des molécules. Nous disposons d'un grand nombre de molécules, au pouvoir inhibiteur réparti de 0 à 99% de l'activité de ThyX *Mtb* (Fig. 4-15).

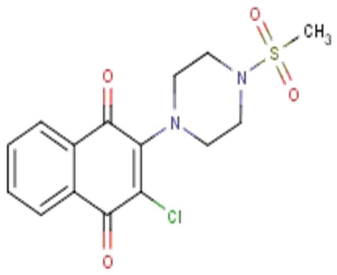
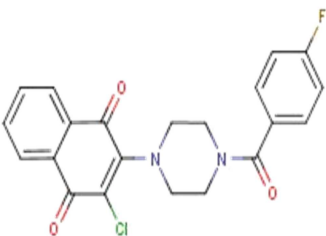
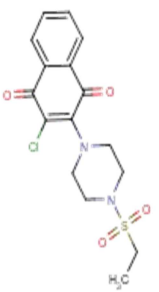
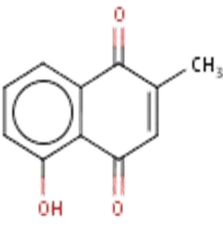
4.2.6 Mode d'inhibition des naphthoquinones sur ThyX *Mtb*

Plusieurs molécules présentaient un pouvoir inhibiteur supérieur à 80% de l'activité de ThyX *Mtb* et nous en avons sélectionné 7 considérées prometteuses.

Les naphthoquinones ne semblent pas cibler le site de fixation du dUMP dans ThyX *Mtb*. C'est pourquoi j'ai entrepris dans un premier temps de caractériser le type d'inhibition de ces sept naphthoquinones sur ThyX *Mtb*. J'ai vérifié dans un second temps leur activité sur la thymidylate synthase humaine *hThyA*. Enfin, j'ai estimé leur pouvoir antimycobactérien en mesurant la concentration minimal d'inhibition de croissance de *M. smegmatis*.

Tableau 6 : Nouvelle série d'inhibiteurs de type Naphthoquinone de ThyX *Mtb*.

Structure	ID	Mol Weight	cLogP	LogSW	Pourcentage d'inhibition	Déviati on standard du % d'inhibition
	B6	320.3	3.02	-4.115	85,15	1,90
	D4	266.3	4.15	-4.687	93,15	3,61
	D5	278.3	3.93	-4.586	88,60	8,20

	E1	354.8	2.52	-2.931	94,35	5,02
	F1	398.8	3.91	-5.447	86,15	7,00
	F2	368.8	3.05	-3.486	93,95	5,16
	G7	181,18	1,77		95,37	

4.2.6.1 Détermination du type d'inhibition

Nous disposons de deux tests d'activité pour ThyX : le test d'oxydation du NADPH et le test de déprotonation du $[5H^3]dUMP$. Aucune des molécules testées n'inhibe l'oxydation du NADPH par ThyX *Mtb* (non montré). Nous avons par conséquent entrepris de caractériser le type d'inhibition des molécules tableau 6 en n'utilisant uniquement le test de déprotonation.

Afin de mesurer l'activité de l'enzyme et donc son inhibition, nous nous plaçons en conditions michaélienne, c'est-à-dire une concentration d'enzyme assez faible devant la concentration en substrat pour que dans les conditions initiales, son activité soit linéaire dans le temps de la mesure.

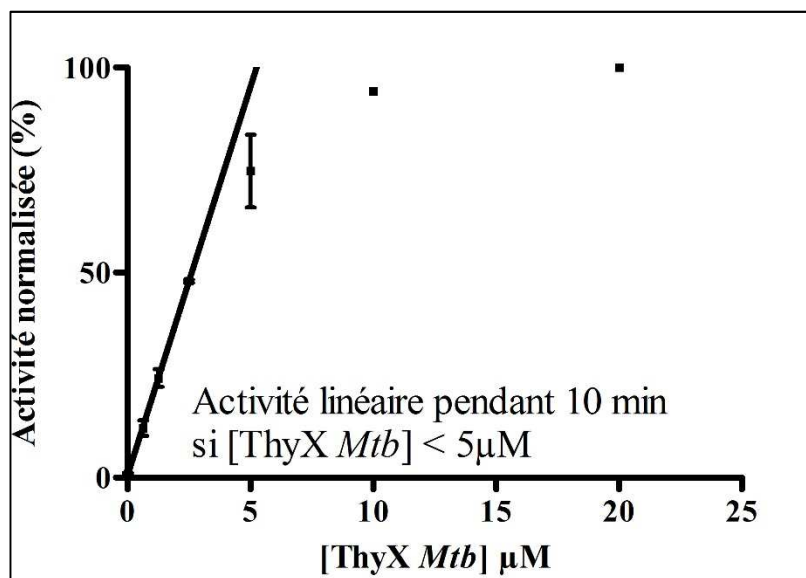


Figure 4-16 : Mesure de l'activité de ThyX *Mtb* en fonction de sa concentration. La réaction a été réalisée en présence de 50 μM de dUMP, 50 μM de CH₂H₄folate, 1 mM de NADPH, 500 μM de FAD. Le [5H³]dUMP est utilisé comme traceur. Les réactions sont initiées par l'ajout de ThyX *Mtb*. Les réactions sont arrêtées après 10 min à 37°C par l'ajout d'une solution de TCA (2%) et de charbon actif.

Nous observons dans la figure 4-16 que l'activité de ThyX *Mtb* est linéaire pendant 10 minutes si la concentration d'enzyme est inférieure à 2,5 μM. En d'autres termes, dans ces conditions, nous mesurons l'activité de la quasi-totalité de la population d'enzyme active. Nous avons estimé la constante catalytique de ThyX *Mtb* à 0.68 min⁻¹ et nous avons réalisé mes mesures avec 1 μM de ThyX *Mtb*.

Dans le but de mesurer l'IC₅₀, nous mesurons l'activité de l'enzyme en présence d'une gamme de concentration d'inhibiteur. Nous avons tracé alors l'activité relative de l'enzyme en fonction de la concentration en inhibiteur (Fig. 4-18. A et B). Les courbes d'inhibition sont approximées à l'équation (21).

$$v = v_{max}e^{-kI} + v_{min} \quad (21)$$

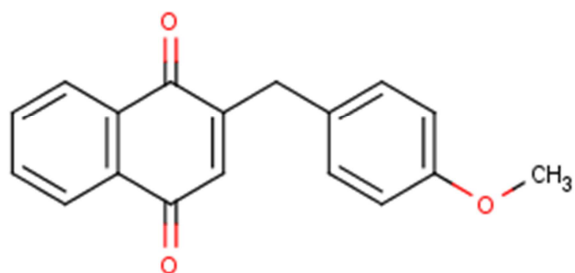
où v est la vitesse initiale mesurée, v_{max} est la vitesse en absence d'inhibiteur, v_{min} la vitesse à forte concentration en inhibiteur, plateau bas de la courbe (qui est égale à 0 si l'inhibition est totale), et

$$k = \frac{\ln(1 + \frac{I}{IC_{50}})}{I} \quad (22)$$

d'où

$$IC_{50} = \frac{\ln 2}{k} \quad (23)$$

Par exemple, pour la molécule D5 (Fig. 4-17), de formule 2-[(4-methoxyphenyl) méthyl]-1,4-dihydronaphthalene-1,4-dione, nous avons mesuré l'activité relative de ThyX *Mtb* en présence d'une concentration croissante d'inhibiteur, pour des concentrations de substrat différentes.



2-[(4-methoxyphenyl)méthyl]-1,4-dihydronaphthalene-1,4-dione

Figure 4-17 : Structure de la molécule D5, de formule 2-[(4-methoxyphenyl)méthyl]-1,4-dihydronaphthalene-1,4-dione.

Nous observons dans la figure 4-18 A et B, les courbes d'inhibition obtenues pour D5 pour différentes concentration en dUMP et en CH₂H₄folate respectivement. L'IC₅₀ mesuré est ensuite tracé en fonction de la concentration en substrat pour le dUMP et le CH₂H₄folate, figure 4-18 C et D, respectivement.

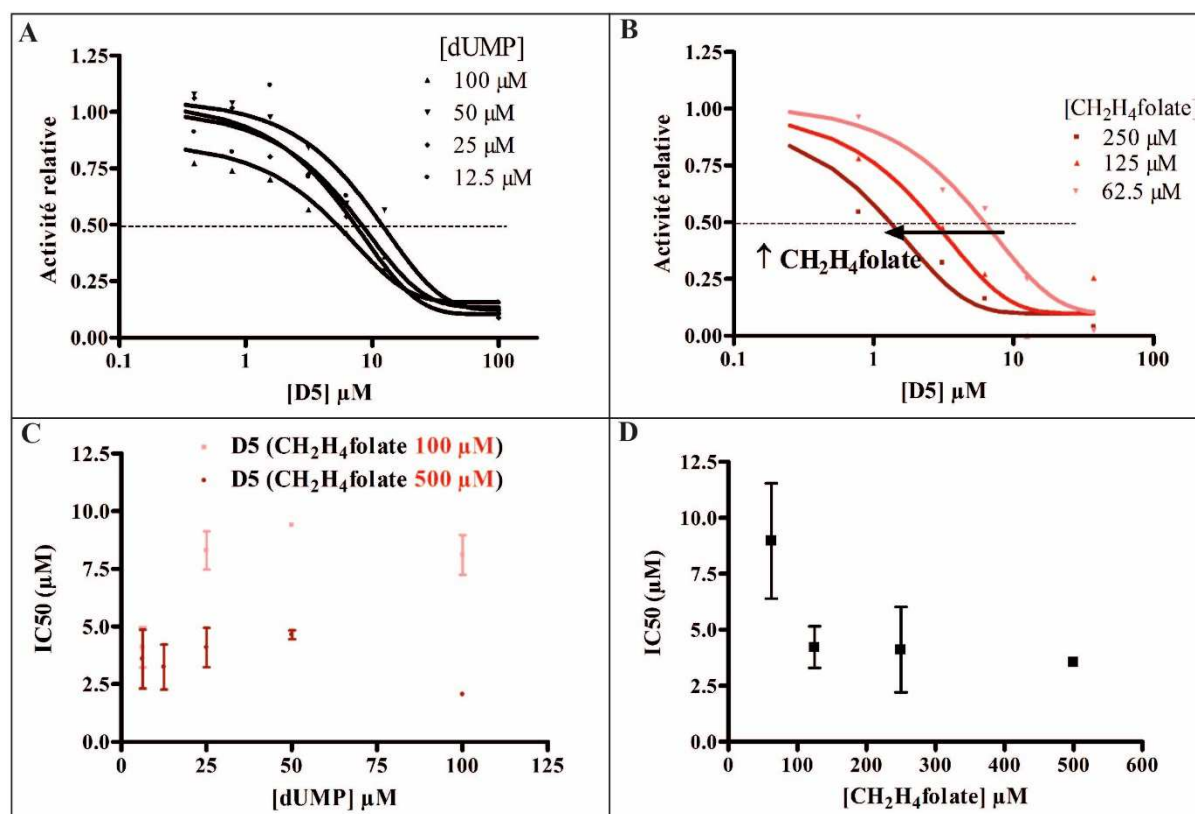


Figure 4-18 : Détermination du mode d'inhibition de D5. L'activité de 1 μM de ThyX *Mtb* a été mesurée pour une gamme de concentration d'inhibiteurs pour différentes concentration de substrat (dUMP et CH₂H₄folate). L'activité relative correspond à l'activité mesurée normalisée par rapport à l'activité en absence d'inhibiteur dans les mêmes conditions. En faisant varier la concentration d'un substrat, nous plaçons le second en excès sauf si mentionné. A) Activité relative de ThyX *Mtb* en fonction de la concentration de D5 pour différentes concentration de dUMP. B) Activité relative de ThyX *Mtb* en fonction de la concentration de D5 pour différentes concentration de CH₂H₄folate. C) IC₅₀ de D5 en fonction de la concentration en dUMP pour différentes concentration de CH₂H₄folate. D) IC₅₀ de D5 en fonction de la concentration en CH₂H₄folate.

Nous pouvons voir dans la figure 4-18 C que l'IC₅₀ de D5 ne varie pas en fonction de la concentration en dUMP pour une concentration de CH₂H₄folate donnée.

Nous pouvons noter une variabilité de l'IC₅₀ (barres d'erreur, Fig. 4-18.C). Cette variabilité reflète en réalité une instabilité de l'activité mesurée de ThyX *Mtb*, et nous ne sommes pas encore parvenus à en élucider les raisons. Nous pouvons néanmoins conclure que l'inhibition de ThyX *Mtb* par D5 est non-compétitive vis-à-vis du dUMP.

En fonction de la concentration en CH₂H₄folate, figure 4-18.D, nous pouvons voir que l'IC₅₀ de D5 diminue en fonction de la concentration en substrat, présentant le profil caractéristique d'un inhibiteur incompétitif en adéquation avec les IC₅₀ présentés figure 4-18.C pour différentes concentrations en CH₂H₄folate. Ces résultats suggèrent que D5 se fixe préférentiellement au complexe ThyX-dUMP-CH₂H₄folate pour inhiber la réaction.

Ce mode d'inhibition a été très surprenant car il est différent de celui observé précédemment par les naphthoquinones sur ThyX *PBCV-1* où nous observions une inhibition compétitive par rapport au dUMP.

De la même manière, nous avons caractérisé les modes d'inhibition des molécules sélectionnées dans le tableau 6. Nous avons pu observer des comportements très différents des molécules par rapport à l'un ou l'autre

substrat. Par soucis de clarté, nous présentons les molécules en fonction de l'espace chimique qu'elles semblent occuper :

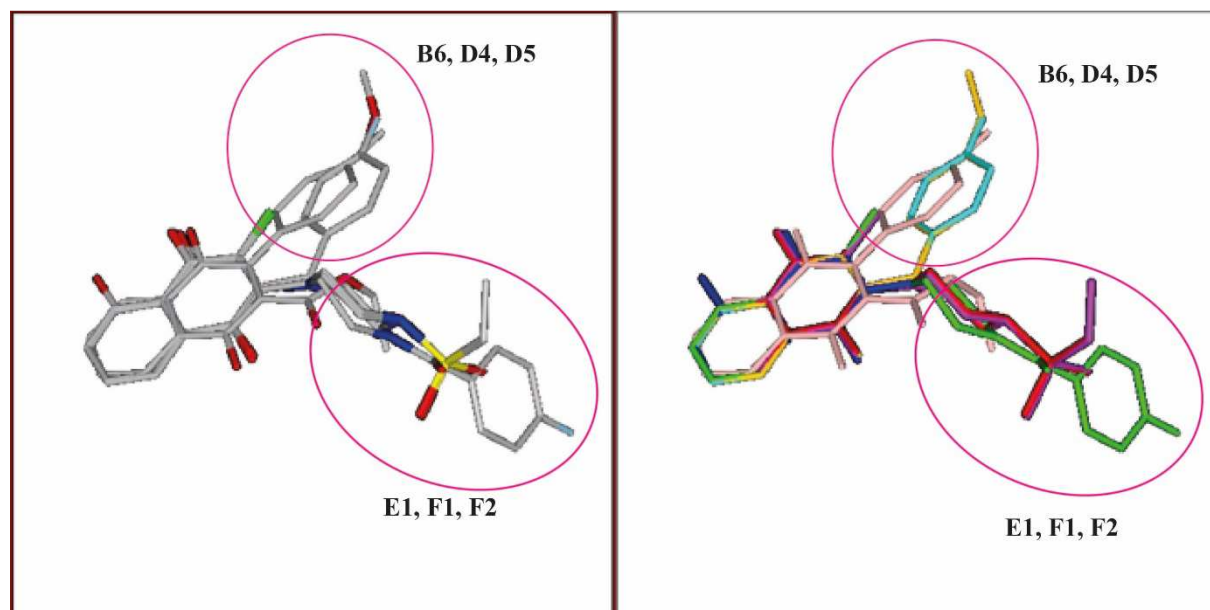


Figure 4-19 : Alignement tridimensionnel des 7 molécules sélectionnées à l'issue du crible, tableau 6. L'alignement a été réalisé avec Marvin Sketch.

Le programme Marvin Sketch (Chemaxon, Hongrie) nous permet d'aligner dans l'espace nos différentes molécules. En alignant dans l'espace les 7 molécules (Tableau 6), nous pouvons voir deux groupes se former en fonction des groupements additionnés au cœur naphthoquinone. Dans le groupe composé de B6, D4, et D5 (Fig. 4-19), nous observons que les anneaux aromatiques des groupements ajoutés au noyau naphthoquinone, se chevauchent dans l'espace. Le second groupe est composé d'E1, F1 et F2. Ces molécules occupent un espace différent du groupe précédent (B6, D4, D5).

Pour le groupe composé d'E1, F1, F2, nous avons constaté un comportement intéressant des molécules sur le type d'inhibition :

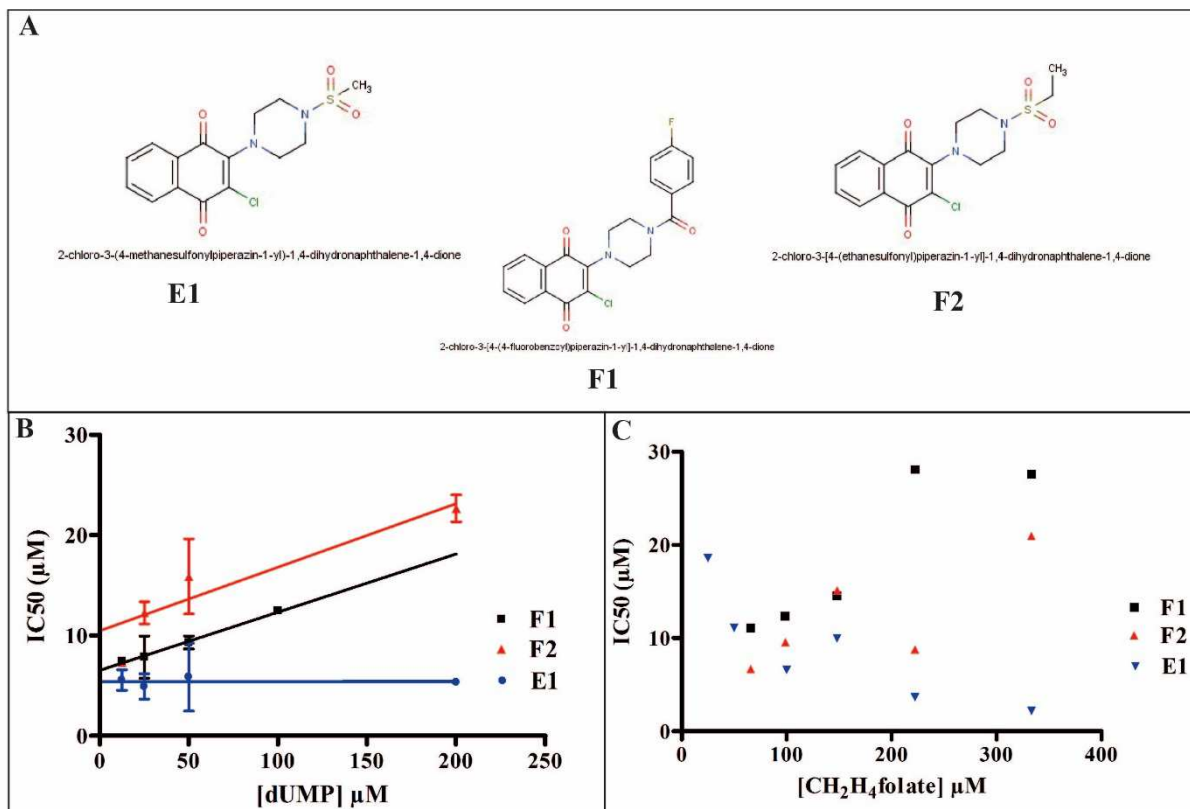


Figure 4-20 : Mode d'inhibition d'E1, F1, et F2 en fonction du dUMP et du $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$. L'activité de 1 μM de ThyX *Mtb* a été mesurée pour une gamme de concentration d'inhibiteurs (0 à 100 μM) pour différentes concentration de substrat (12,5 à 200 μM de dUMP et 25 à 330 μM de $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$). L'activité relative correspond à l'activité mesurée normalisée par rapport à l'activité en absence d'inhibiteur dans les mêmes conditions. En faisant varier la concentration d'un substrat, on place le second en excès. A) Structure et nom IUPAC de E1, F1 et F2 B) IC_{50} en fonction de la concentration en dUMP. C) IC_{50} en fonction de la concentration en $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$.

Nous pouvons voir dans la figure 4-20 que les IC_{50} de F1 et F2 augmentent en fonction de la concentration des deux substrats, dUMP et $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$. F1 et F2 sont donc compétitif de ces deux substrats. Cela suggère que la fixation de F1 et F2 gêne celle du dUMP et du $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$. Par conséquent, le site de fixation de F1 et F2 est probablement en chevauchement avec le site de fixation des deux substrats. L'hypothèse la plus simple serait de

dire que ces molécules se fixent à un site à l'interface entre les sous-sites de fixation des deux substrats.

L' IC_{50} de E1 est constant en fonction de la concentration en dUMP et décroît de 18 μM à 2 μM en fonction de la concentration en $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$. E1 est par conséquent non-compétitif du dUMP et incompétitif du $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$. Il semble donc qu'E1 se fixe préférentiellement au complexe ThyX-dUMP- $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$, au même titre que D5.

Le second groupe comprend B6, D4, D5 et G7. Nous avons déjà présenté les résultats obtenus pour D5, nous nous concentrerons donc ici sur B6, D4 et G7.

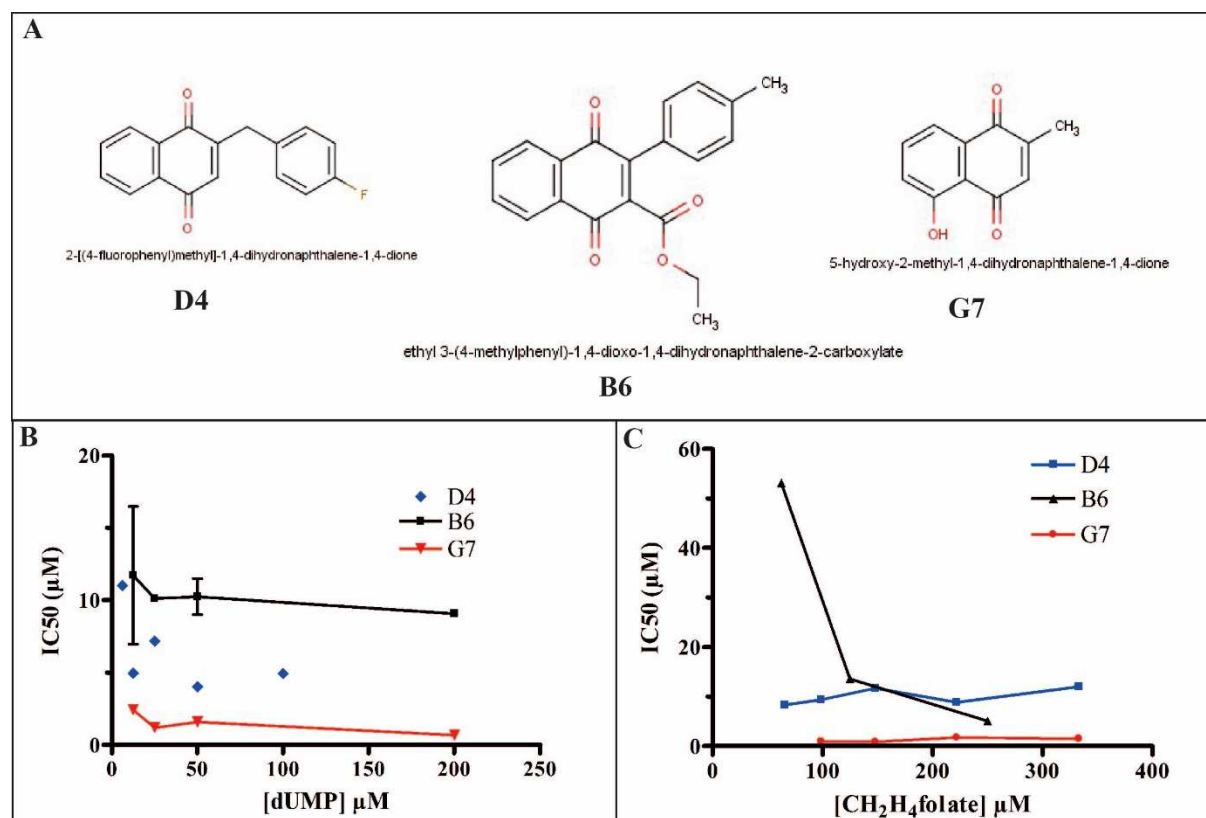


Figure 4-21 : Mode d'inhibition de D4, B6 et G7 en fonction du dUMP et du CH₂H₄folate. L'activité de 1 µM de ThyX *Mtb* a été mesurée pour une gamme de concentration d'inhibiteurs pour différentes concentration de substrat (dUMP et CH₂H₄folate). En faisant varier la concentration d'un substrat, nous plaçons le second en excès. Les activités relatives ont été tracées en fonction de la concentration en inhibiteur et l'IC₅₀ estimé à partir de l'équation (20). A) Structure et nom IUPAC de D4, B6 et G7. B) IC₅₀ des inhibiteurs en fonction de la concentration en dUMP. C) IC₅₀ des inhibiteurs en fonction de la concentration en CH₂H₄folate.

Nous pouvons apprécier dans la figure 4-21 la détermination du type d'inhibition de ces 3 molécules en fonction du dUMP ou du CH₂H₄folate.

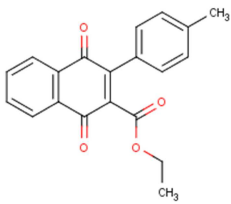
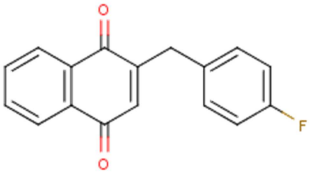
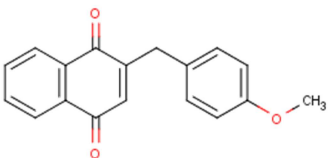
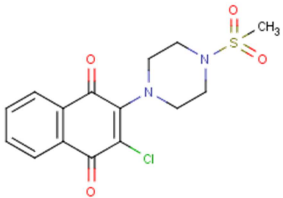
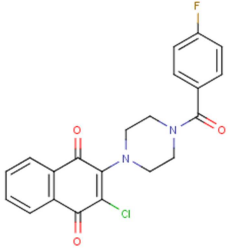
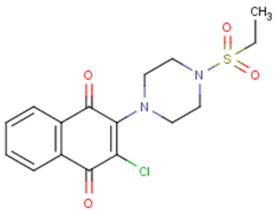
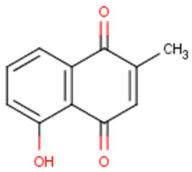
Les IC50s de D4 et G7 ne varient pas en fonction de la concentration du dUMP ou du CH₂H₄folate. Ces deux molécules sont des inhibiteurs non-compétitifs de ThyX *Mtb* et présente une affinité similaire pour l'enzyme seule ou en complexe.

B6 affiche un profil non-compétitif similaire en fonction de la concentration en dUMP. Cependant, l'IC50 de B6 semble diminuer en fonction de la concentration en CH₂H₄folate. B6 est par conséquent un inhibiteur incompétitif de ThyX *Mtb* viv-à-vis de la fixation CH₂H₄folate, au même titre que D5 et E1.

Pour chaque molécule, en fonction du mode d'inhibition, nous avons appliqué la formule appropriée tableau 4 afin de calculer le *Ki* moyen en fonction d'un ou de l'autre substrat.

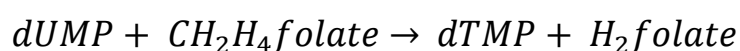
Tableau 7 : Constante et mode d'inhibition des inhibiteurs de ThyX *Mtb* identifiés. Vert : **Compétitif**.

Bleu : **Non-compétitif**. Rouge : **Incompétitif**

Structure	Nom	K_i moyen (dUMP) μM	K_i moyen ($\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$) μM
	B6	9.96	7.72
	D4	2.36	9.55
	D5	2.13	2.18
	E1	2.50	1.05
	F1	2.44	2.85
	F2	4.80	1.87
	G7	0.56	0.504

4.2.7 Inhibition de la ThyA humaine

Afin d'évaluer la spécificité de nos molécules pour ThyX, nous avons testé leur effet sur l'activité de la ThyA humaine (*hThyA*). ThyA catalyse la méthylation réductrice du dUMP en dTMP, mais utilise le CH₂H₄folate à la fois comme donneur de carbone et d'hydrure. Elle ne nécessite pas de NADPH, et la réaction qu'elle catalyse est la suivante :



Contrairement à ThyX, ThyA produit du H₂folate. Le produit de la réaction, H₂folate, absorbe à 340nm à l'inverse du substrat CH₂H₄folate qui n'absorbe pas à cette longueur d'onde. Nous avons donc dosé l'activité de *hThyA* en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 340nm en fonction du temps. Cette augmentation traduit la formation du produit de la réaction, le H₂folate.

Nous avons commencé par une mise au point du test d'activité de *hThyA* afin de nous assurer d'être en condition michaélienne (Fig. 4-22.A).

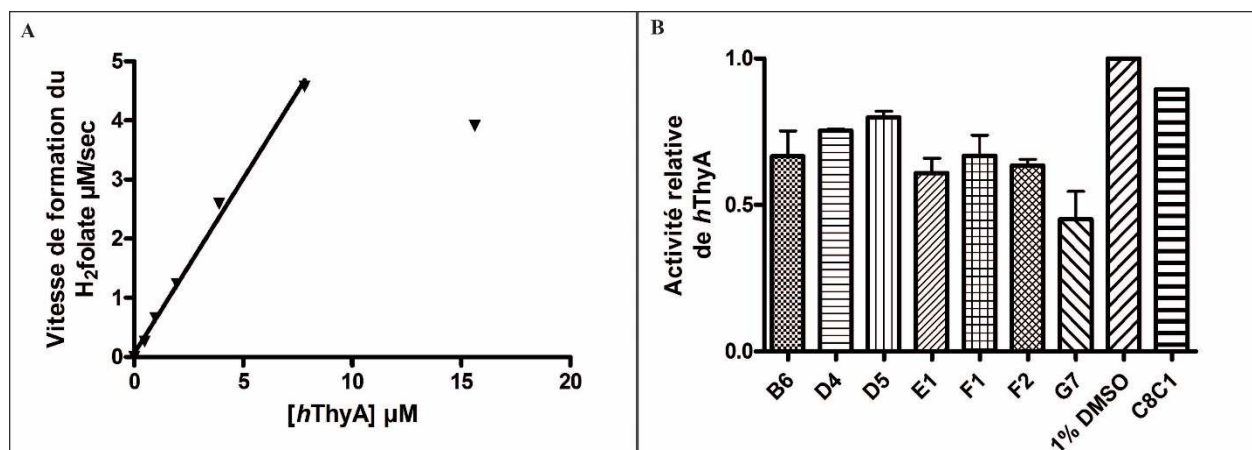


Figure 4-22 : Effet des inhibiteurs de ThyX *Mtb* sur *hThyA*. L'activité de 5 μM de *hThyA* a été mesurée à 340nm en fonction du temps, en présence de 200 μM de CH₂H₄folate et 200 μM de dUMP. A) Vitesse de formation du H₂folate en fonction de la concentration en *hThyA*. L'activité est calculée sur les 10 secondes initiales de la cinétique de réaction. B) Effet des inhibiteurs de ThyX *Mtb* à 100 μM sur l'activité de 5 μM de *hThyA*.

Dans la figure 4-22.A, nous pouvons voir que la vitesse de formation du H₂folate est linéaire si la concentration en *hThyA* est inférieure à environ 10 μM. Nous avons estimé le k_{cat} de *hThyA* à 35 min⁻¹ dans ces conditions.

Nous avons testé l'effet de 100 μM de chaque molécule tableau 6, sur l'activité de 5 μM de *hThyA* dans ces mêmes conditions. C8C1 est utilisée comme contrôle car nous avons montré que cette naphthoquinone n'est pas cytotoxique et n'inhibe pas *hThyA* [76, 94].

Nous observons dans la figure 4-22.B l'inhibition modérée de l'activité de *hThyA* par les inhibiteurs de ThyX *Mtb*. L'inhibition de ThyX *Mtb* était supérieure à 80% pour ces molécules à 100 μM. Nous pouvons en conclure que

malgré un effet modéré, nos inhibiteurs sont sélectifs de ThyX *Mtb* par rapport à *hThyA*.

4.2.8 Mesure de l'effet antimycobactérien

Afin d'estimer le pouvoir antimycobactérien de ces molécules, je les ai testés pour l'inhibition de la croissance de *Mycobacterium smegmatis*, une mycobactérie non pathogène qui porte ThyX. *Mycobacterium smegmatis* est souvent utilisée comme modèle d'étude de mycobactéries en raison de sa faible pathogénicité, et sa croissance rapide (temps de génération : 3 heures) comparé à celle de *Mtb* (temps de génération : 24h) [127].

L'effet antimycobactérien se mesure en exposant les bactéries en culture à des concentrations croissantes de molécule testée. Ces expériences ont été réalisées sur des plaques de culture de 24 puits.

Nous avons effectué dans un premier temps une préculture de *M. smegmatis* pendant une nuit à 37°C. Cette préculture est ensuite diluée à DO_{590nm} de 0,05, et distribuée dans une plaque dans laquelle étaient déjà répartis les gammes de molécules ainsi que les contrôles en absence de molécules (1% DMSO, concentration maximale pour laquelle nous n'observons pas d'effet du DMSO sur la croissance de *M. smegmatis*). Après 8 heures de culture, les DO_{590nm} sont mesurées pour chaque puit. Certaines molécules absorbent la lumière à 590nm. Par conséquent, nous avons soustrait à chaque valeur la DO_{590nm} mesurée pour l'inhibiteur seul (à la concentration appropriée) dans le

milieu de culture. Cela permet d'estimer la croissance relative de *M. smegmatis* en présence de concentration croissante d'inhibiteur de ThyX *Mtb* (Fig. 4-23).

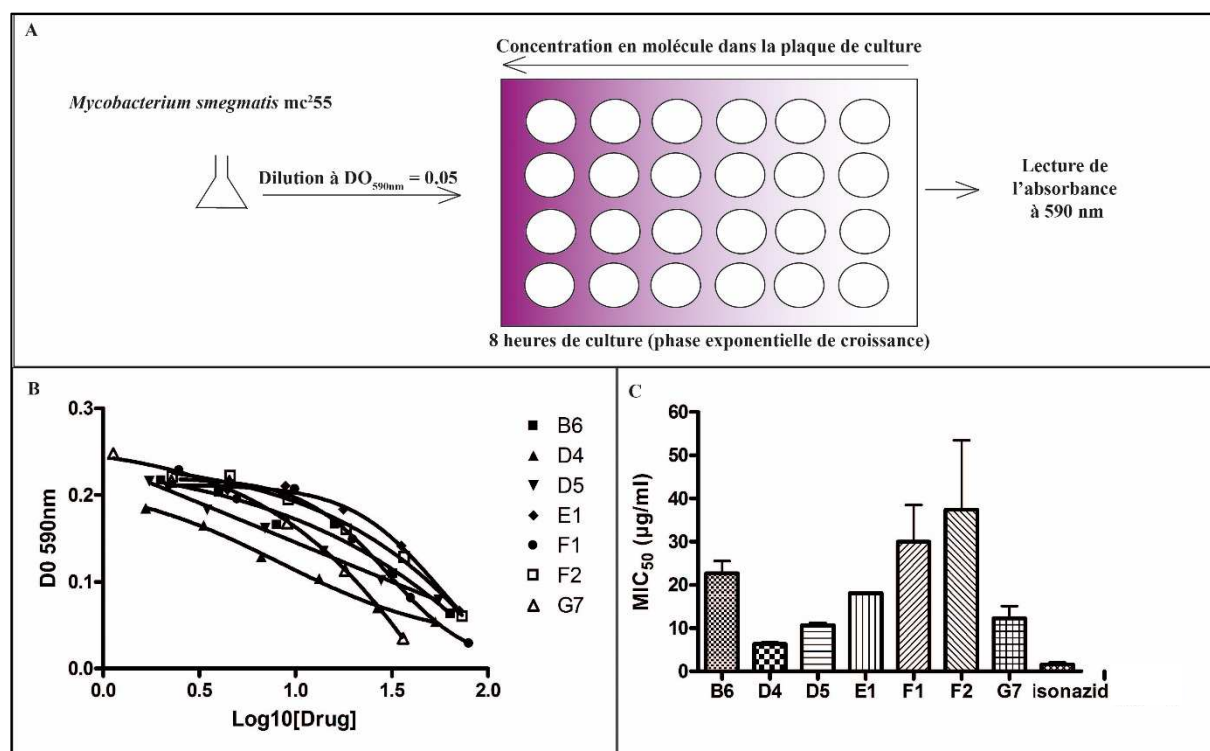


Figure 4-23 : Détermination de la MIC₅₀ des molécules sur *Mycobacterium smegmatis*. *M. smegmatis* est cultivée dans un milieu Middlebrook 7H9 en présence d'1% de DMSO à 37°C overnight. La culture est diluée dans le même milieu avec 1% de DMSO jusqu'à DO_{590nm} de 0,05, et répartie sur la plaque en présence de concentration croissante de molécule testée. L'isoniazide est utilisé comme contrôle positif. B) Effet Dose-Réponse des molécules sur les cultures de *M. smegmatis* : L'absorbance est mesurée à 590 nm après 8 heures de culture. Nous y soustrayons l'absorbance à 590 nm de la molécule seule dans le milieu de culture en présence de 1% DMSO. Le résultat est ensuite tracé en fonction de la concentration en molécule et ajusté à une équation de dose réponse sigmoïdale : $Y = Bottom + \frac{(Top-Bottom)}{(1+10^{(\log(MIC_{50}-[molécule])})})}$ C) MIC₅₀ de chaque molécule, déterminée à partir de trois expériences indépendantes de Dose-Réponse (B).

Toutes les molécules présentent un effet antimycobactérien et les MIC₅₀ varient de 5 à 37 µg/ml pour les molécules testées (Fig. 4-23).

Ce résultat fut très encourageant mais la transposition directe d'un effet antibactérien de *M. smegmatis* à *M. tuberculosis* n'est pas possible [128]. Nous

avons cependant assez d'éléments pour de tester ces molécules sur *Mtb* via une collaboration avec la Pr Valérie Mizrahi à l'université de Cape Town (Afrique Du Sud).

4.2.9 Modèle pharmacophore et bayésien d'inhibition de ThyX *Mtb*

Nous avons criblé au total 115 naphthoquinones pour l'inhibition de ThyX *Mtb* et nous avons caractérisé les inhibiteurs identifiés, résultats « positifs » du crible. Mais l'échantillon total de molécules présentes différents niveaux d'inhibition de ThyX *Mtb* (Fig. 4-15). Ces résultats, « positifs » et « négatifs » sont riches en informations car ils lient la structure tridimensionnelle d'une molécule à un niveau d'inhibition de ThyX *Mtb*. L'étude quantitative de la relation structure-activité des molécules nous a permis, en collaboration avec le Dr Sean Ekins de Collaborative Drug Discovery (CDD), de construire une série de modèles, pharmacophores et bayésiens, sur la base de ces résultats.

Un modèle pharmacophore est un ensemble des groupements (polaire, hydrophobe, etc) et de volumes exclus, répartis dans l'espace qui sont corrélés à une activité de la molécule sur sa cible. Il décrit les « bonnes » et « mauvaises » caractéristiques des molécules dans l'ensemble testé, et extrapole les résultats afin de classer *in silico* des molécules non testées, et proposer de nouveaux inhibiteurs à tester *in vitro* et *in vivo*.

Notre modèle pharmacophore a été réalisé avec Discovery Studio (Biovia, San Diego, CA). Il a permis d'identifier des caractéristiques moléculaires essentielles à l'inhibition de ThyX *Mtb* dans l'espace : volumes exclus, 2 accepteurs de liaison hydrogène ainsi qu'une caractéristique hydrophobe (Fig. 4-24).

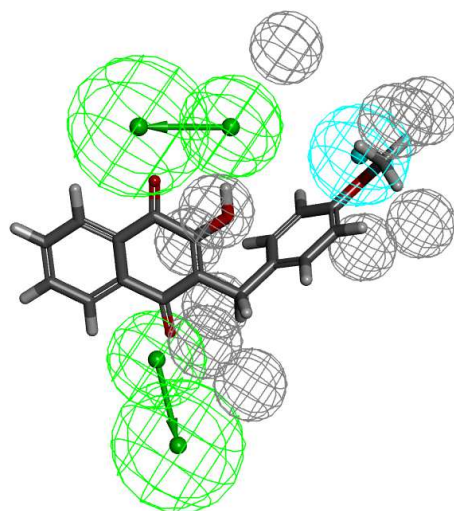


Figure 4-24 : C8C1 dans le modèle pharmacophore construit pour ThyX *Mtb*. Gris : volume exclus. Vert : accepteur de liaison hydrogène. Bleu : Hydrophobe. Image réalisée par Sean Ekins (CDD).

Ce travail collaboratif fait l'objet d'une publication qui est aujourd'hui en préparation.

Manuscript in preparation

Molecules targeted towards thymidylate synthase ThyX in *Mycobacterium tuberculosis*

Kamel Djaout¹, Vinayak Singh², Yap Boum³, Victoria Katawera³, Hubert Becker¹, Natassja G. Bush⁴, Stephen J. Hearnshaw^{4,¶}, Jennifer E. Pritchard^{4,§}, Pauline Bourbon⁵, Peter B. Madrid⁵, Anthony Maxwell⁴, Valerie Mizrahi², Hannu Myllykallio^{1,*} & Sean Ekins^{6,7,*}

¹Laboratoire d'Optique et Biosciences - CNRS/INSERM, Département d'Enseignement-Recherche de Biologie - Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau – France.

²MRC/NHLS/UCT Molecular Mycobacteriology Research Unit & DST/NRF Centre of Excellence for Biomedical TB Research, Institute of Infectious Diseases and Molecular Medicine and Division of Medical Microbiology, Faculty of Health Sciences, University of Cape Town, Anzio Road, Observatory 7925, Rondebosch, Cape Town 7700, South Africa.

³Epicentre Mbarara Research Base, Microbiology Department, Faculty of Medicine, Mbarara University of Science and Technology, Uganda.

⁴Department of Biological Chemistry, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, UK.

⁵SRI International, 333 Ravenswood Avenue, Menlo Park, CA 94025, USA.

⁶Collaborative Drug Discovery, 1633 Bayshore Highway, Suite 342, Burlingame, CA 94403, USA

⁷Collaborations in Chemistry, 5616 Hilltop Needmore Road, Fuquay-Varina, NC 27526, USA.

Present addresses:

[¶]Stephen Hearnshaw, Inspiralis Ltd., Norwich Biocubator, Norwich Research Park, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK

[§]Jennifer Pritchard, Birkbeck College, Univ. London WC1E 7HX, UK

Running Head: ThyX and GyrB models for Mtb

Key words: Bayesian models; Cheminformatics; thymidylate synthase ThyX, GyrB, Machine learning; *Mycobacterium tuberculosis*; Pharmacophore; naphthoquinones

ABSTRACT

There is an urgent need to identify new treatments for tuberculosis (TB), an infectious disease caused by the major human pathogen, *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), which results in 1.5 million deaths each year. We have targeted two essential enzymes in this organism that are promising for antibacterial therapy and reported to be inhibited by naphthoquinones. ThyX is an essential thymidylate synthase that is both mechanistically and structurally unrelated to the analogous human enzyme. DNA gyrase (GyrB) is a DNA topoisomerase present in bacteria and plants but not animals. The current study set out to understand the structure-activity relationships of these targets using computational and experimental approaches against a reference *Mtb* strain H37Rv, and a panel of drug-resistant clinical isolates. ThyX was more permissive in terms of inhibition whereas GyrB appears to be inhibited by a very narrow range of naphthoquinones. Cheminformatics models identified new actives that were shown to target ThyX selectively *in vitro*. Furthermore, two of the newly identified compounds, one selected by *in vitro* screening and the second predicted by our pharmacophore model, exhibited selectivity for ThyX *in vivo* that was demonstrated using a conditional transcriptional depletion of the ThyX in living *Mtb* cells.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is a major infectious disease that knows no geographic boundary and accounts for 9 million new cases and approximately 1.5 million deaths each year (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf?ua=1). TB and its etiological agent *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) are the focus of intense efforts to develop new tools for the control and eventual elimination¹ of this devastating disease, which is associated increasingly with resistance to first- and second-line drugs². The discovery of new TB drug candidates with novel mechanisms of action to overcome resistance, shorten the duration of treatment, and avoid toxicity that may occur in patients co-infected with HIV, is of fundamental importance in this regard³⁻⁵. Over the last decade, there has been considerable investment in TB drug discovery with particular emphasis on the use of high-throughput phenotypic screening of libraries of thousands to hundreds of thousands of molecules for “hit” identification^{4, 6-8}. Whole-cell approaches have the advantage of allowing the high-throughput screening (HTS) assay to be conducted under

conditions that mimic host infection without knowledge of mechanism of action⁹. Importantly, all presently used antibiotics have been developed by this approach, including the recently approved drug, bedaquiline¹⁰. Moreover, the phenotypic screening format produces a wealth of data that can be used for computational machine learning¹¹, which has the potential to improve the screening efficiency of additional compounds.

An alternative approach to hit identification is target-based, which relies on the availability of purified protein against which a HTS can be performed⁹ and/or knowledge of the target, such as the crystal structure, to guide structure-based drug design. Drawbacks of this approach include the difficulty in balancing target activity with the physicochemical properties needed to enter whole cells and evade efflux. This approach also requires extensive validation of the target. A recent review summarized the results of target-based and phenotypic screens conducted at the Novartis Institute for Tropical Diseases. After failing with target-based screens, phenotypic screens led to the identification of 5 chemical series in 7 years. Of these, 3 series were terminated due to glycerol-dependent activity which is irrelevant in *Mtb*, lack of *in vivo*

activity, or limited maximum exposure⁹. Target-based screening has also been reviewed to identify the key properties of promising targets such as essentiality for growth, vulnerability, druggability, reduced propensity for resistance, and target localization as well as amenability to chemotherapy¹².

For a known target, computational approaches such as docking the molecules (into the protein structure), quantitative structure-activity relationship (QSAR), pharmacophore or machine learning models can be developed to screen chemical libraries¹¹. We have previously used these methods to discover inhibitors of 9 essential enzymes through their mimicry of the chemical structure of a given metabolite, and 3D pharmacophores were used to screen over 80,000 commercial compounds. After testing 23 proposed inhibitors or metabolite mimics (including 3 predicted inactive molecules), two acylthioureas were suggested as mimics of D-fructose 1,6-bisphosphate which modestly inhibited the growth of *Mtb*, and have served as a starting point for further optimization¹³. Our approach using 3D pharmacophore model scoring of commercial chemical space, alone or in combination with Bayesian models for antitubercular whole-cell efficacy¹³, represents an intermediate between phenotypic screening and rational structure-based drug design. In more recent work, we have greatly expanded our approach by virtual screening of >206,000 molecules with 66 pharmacophores of essential *Mtb* metabolites or substrates¹⁴. We then assayed 110 compounds *in vitro* to identify 3 compounds possessing whole-cell activity against *Mtb*. Two of the hits were further optimized in a drug discovery workflow¹⁴.

The current study focuses on naphthoquinone (NQ) compounds which have widely reported biological activities including anti-cancer and anti-malarial activities. For instance, atovaquone (2-(trans-4-(P-chlorophenyl)cyclohexyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone), a well-known 2-OH-1,4-NQ, targets the respiratory electron transfer chain, and is clinically used in anti-pneumocystis, anti-toxoplasmosis and anti-malarial treatments. NQs also have anti-microbial activity against different bacterial

pathogens, including *Mtb*¹⁵⁻²¹. Recently, we have demonstrated that NQ-based compounds inhibit the activities of PBCV-1 and *Helicobacter pylori* thymidylate synthase ThyX^{22, 23} as well as *Mtb* DNA gyrase (GyrB)²⁴. These observations led us to investigate inhibition of *Mtb* ThyX by NQs and develop pharmacophore models for these two essential enzymes that are both required for DNA replication²⁵.

ThyX is an essential thymidylate synthase (TS) that is both mechanistically and structurally unrelated to the analogous human enzyme^{26, 27}. ThyX flavoenzymes are a promising antibacterial target²² and catalyze the methylation of 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP) to synthesize 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP), an essential DNA precursor. In this reaction, 5,10-methylenetetrahydrofolate (CH₂H₄folate) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) are used as carbon and hydride donors, respectively. In the case of *Paramecium bursaria chlorella virus-1* ThyX, structural data have revealed stacking of NQ against the flavin adenine dinucleotide (FAD) co-factor, partially overlapping with the dUMP-binding pocket²³. As dUMP acts in the ThyX reaction both as the activator and the substrate²⁸, NQ binding at the ThyX active site results in potent inhibition of ThyX activity. Importantly, unlike human TS, ThyX produces tetrahydrofolate (H₄folate) as a byproduct explaining why many *thyX*-carrying organisms do not require dihydrofolate reductase (FolA)²⁹. Strikingly, although mycobacteria possess two distinct families of thymidylate synthases, the canonical ThyA as well as the non-canonical ThyX, only ThyX is essential in these organisms³⁰. ThyX thus represents a promising target against *Mtb*^{30, 31}, with a crystal structure available [PDB : 2AF6³²]. Several laboratories have developed dUMP analogs to target *Mtb* ThyX, although most of the hits to date are non-selective and also inhibit ThyA^{33, 34}. More recently, conditional depletion of ThyX was shown to result in modest hypersensitivity of *Mtb* to the thymidylate synthase inhibitor and anticancer drug, 5-fluorouracil (5-FU)³⁵, confirming that inhibition of ThyX through metabolic conversion of 5-FU to 5-FdUMP

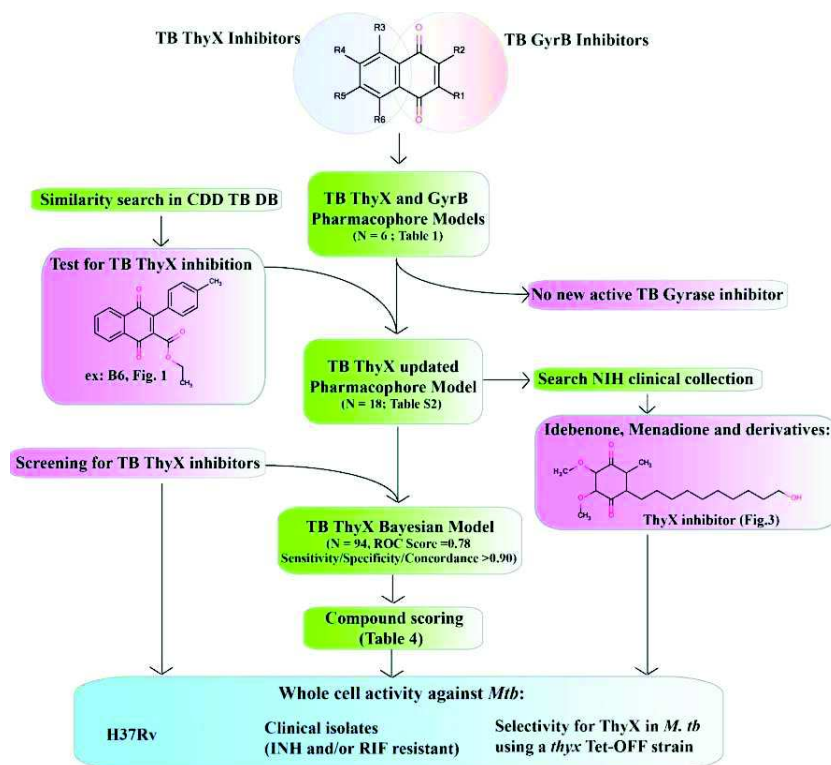


Figure 1: Workflow for combined computational and experimental approaches. *In silico* modelling and scoring of compounds is boxed in green. Enzyme assays are boxed in pink. Whole cell activity measurements are boxed in blue.

comprises one element of the complex mechanism of anti-tubercular action of this drug.

NQs have also been shown to be active against DNA gyrase²⁴ and appear to bind at the N-terminal domain of GyrB²² at a novel site that is distinct from the ATPase active site and the well-established binding site for aminocoumarin antibiotics³⁶. This enzyme is a topoisomerase present in bacteria and plants but not animals, and is a validated target for antibacterials that include the fluoroquinolones, which are important second-line drugs for TB. It consists of two subunits, GyrA and GyrB, which form an A₂B₂ complex in the active enzyme. DNA gyrase catalyzes supercoiling of DNA in an ATP-dependent reaction; the ATPase site resides in the GyrB subunit³⁷.

The observed overlap of NQs binding and inhibiting both ThyX and GyrB from *Mtb* motivated the current study to determine the structure-activity relationships for these proteins in *Mtb* and to identify new inhibitors.

RESULTS

Selective inhibition of ThyX and gyrase using NQs

In this study we utilized a combined computational and experimental workflow (Fig. 1) to obtain new insight into *Mtb* ThyX and DNA gyrase inhibition, and identify new inhibitors for *Mtb* ThyX.

A starting point for this study was the identification of NQs as inhibitors of *Mtb* ThyX and DNA gyrase (Supplementary Table 1). The compounds 2EO4 and C8-C1 that were originally identified as the inhibitors of the *PBCV-1* ThyX enzyme were found to also inhibit *Mtb* ThyX, but were inactive against *Mtb* gyrase. Diospyrin inhibits only *Mtb* gyrase whereas other tested molecules showed comparable activity against both enzymes (Supplementary Table 1). These results revealed that selective or dual inhibition of these enzymes is feasible and prompted further computational analyses to identify additional inhibitors of *Mtb* ThyX and/or gyrase.

Similarity searching and common features pharmacophores used for virtual screening with ThyX

Using the experimental data described in Supplementary Table 1, we were able to build common features pharmacophores for *Mtb* ThyX and gyrase that consisted of excluded volumes, two hydrogen bond acceptors and one hydrophobic feature (Fig. 2). The *Mtb* GyrB pharmacophore used 6 NQs (Fig. 2A) and resulted in the same features as for the *Mtb* ThyX pharmacophore (Fig. 2B), albeit in a different arrangement. Isodiospyrin which inhibits GyrB was predicted to have a poor fit score against *Mtb* ThyX, as shown in Fig. 2C. After similarity searching for previously identified whole-cell active compounds in the CDD TB DB, we identified a *Mtb* ThyX inhibitor, ethyl 3-(4-methylphenyl)-1,4-dioxonaphtalene-2-carboxylate (molecule B6, Fig. 3A), with a K_i of 4.5 μ M (Fig. 3B). This molecule was added into the models to update them. All 19 compounds that we selected for GyrB at this stage were inactive (Supplementary Table 2); however, our approach led to additional compounds that showed substantial activity against ThyX. For example, one pharmacophore with 18 molecules (Supplementary Table 3) was used to search the NIH clinical collection of over 700 compounds, and one quinone compound, idebenone (Fig. 4A), was selected for testing based on its fit to the model (Figure 4B). This molecule was found

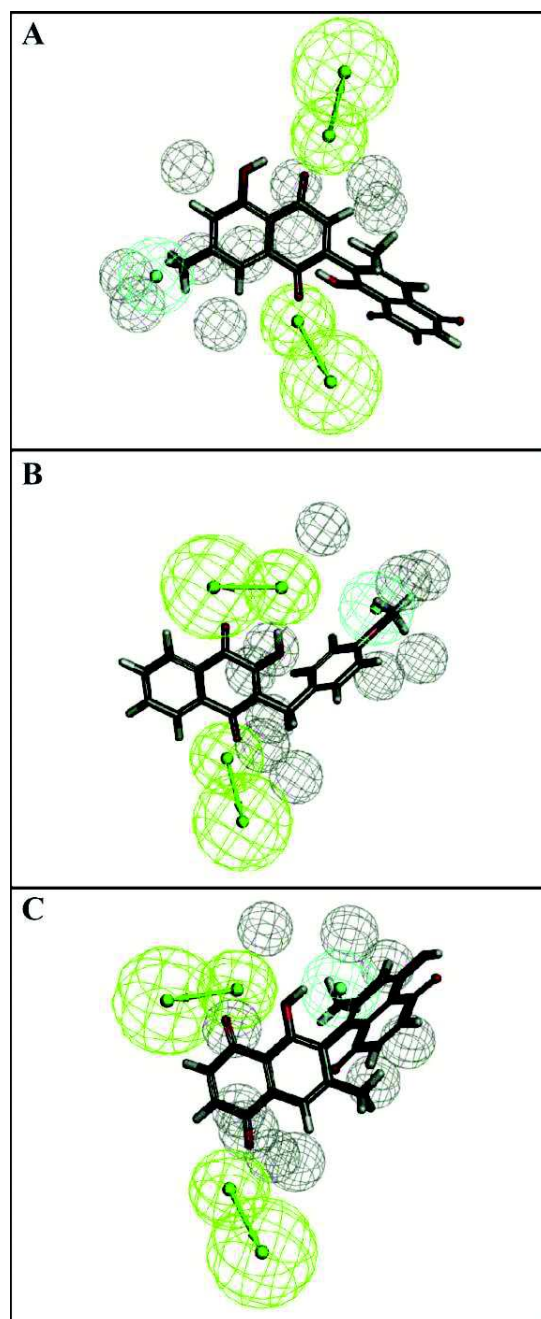


Figure 2: Initial common feature pharmacophores for ThyX and GyrB. A) Diospyrin mapped to the GyrB model, B) C8-C1 mapped to ThyX model. C) ThyX model was used to score isodiospyrin (the fit was poor 0.004). Blue = hydrophobe, green = hydrogen bond acceptor, grey = excluded volume.

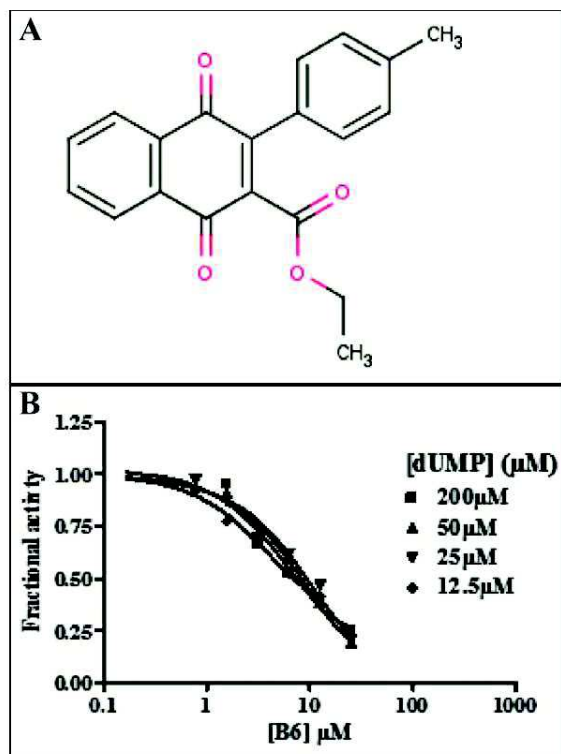


Figure 3: Structure and dose response curve for B6 against ThyX. A) Structure of ethyl 3-(4-methylphenyl)-1,4-dioxonaphthalene-2-carboxylate (B6), a NQ identified by similarity searching in the CDD Public database of previously tested compounds against *Mtb* with known whole cell activity. B) B6 dose response curves versus ThyX.

to be an uncompetitive inhibitor of *Mtb* ThyX with respect to dUMP binding ($K_i = 3.3 \mu\text{M}$, Fig. 5), suggesting that it binds preferentially to the ThyX-dUMP complex. It also has weak whole-cell activity against *Mtb*, as exemplified by MIC_{90} value of $125 \mu\text{M}$ (Supplementary Table 4). This table also shows the whole-cell activity of several other compounds against replicating *Mtb*: B6, D4, D5, E1, E10, F1 and F2 were identified by screening against the *Mtb* ThyX (Figure 1, left track) whereas idebenone was selected from a search of the NIH clinical collection using the N18 pharmacophore as potential ThyX inhibitor. Compounds 007A-010K (referred to herein as a test set) were independently scored with the Bayesian model (N94) and tested for activity against *Mtb* and ThyX. Interestingly, we have also tested a menadione which was active against *Mtb* while some analogs were less active (Supplementary Table 5).

Predicting new ThyX inhibitors using Bayesian machine learning models

In prior work, we have used Bayesian machine learning to build models of whole-cell screens of small molecule compounds active against *Mtb*³⁸, and these models in turn have been used for prospective identification of new compounds. After testing 94 molecules against *Mtb* ThyX at $100 \mu\text{M}$ (the training set, Supplemental SDF File), we generated a Bayesian model using molecules with $>70\%$ inhibition as actives. This resulted in a model with a ROC score of 0.78 after 5-fold cross validation, alongside sensitivity, specificity and concordance values greater than 0.90 (Supplementary Fig. 1A,) which would point to a very good model. The ‘good’ features were predominantly quinones and NQs (Supplementary Fig. 1B), while ‘bad’ features included amines and sulfonamides (Supplementary Fig 1C). A model with similar statistics was generated in CDD models using FCFP6 descriptors alone, with a 3-fold cross validation ROC score of 0.80 (Supplementary Fig 2).

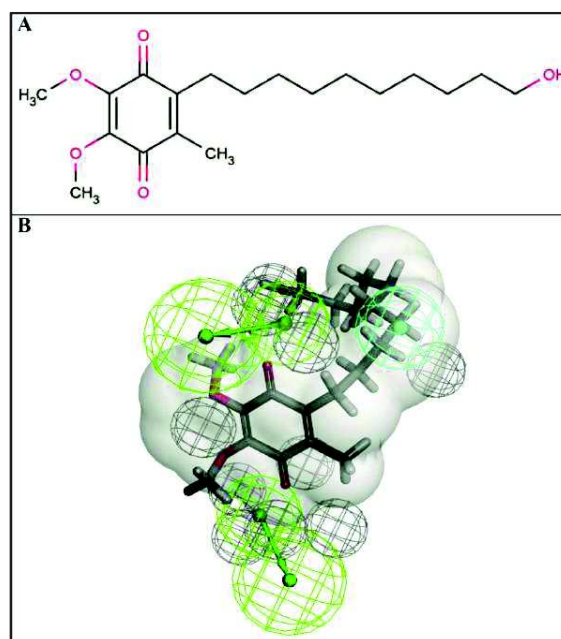


Figure 4: Idebenone mapped to the ThyX N=18 pharmacophore model. A) idebenone 2D structure. B) Pharmacophore showing van der Waals surface based on C8-C1, Blue = hydrophobe, green = hydrogen bond acceptor, grey = excluded volume.

ThyX Bayesian model NQs test set

The Bayesian model generated with Discovery Studio was used to predict activity of 14 compounds (Supplementary Table 6) which were not included in the training set. The closest distance calculation uses the calculated Euclidean distance between each molecule and those in the training set and suggest they are different (a value of zero = identity). Two of these molecules were predicted as “inactive” (010-I and 010-C, Supplementary Table 6). However, six of the remaining 12 compounds (50%) exhibited over 70% inhibition (the selected cut-off) of *Mtb* ThyX activity *in vitro* at 100 μM . These experimental results clearly illustrate the robustness of our models.

Whole-cell activity and target specificity in *Mtb*

The NQs in the test set (Supplementary Table 6) were then assessed for whole-cell activity against a set of clinical isolates of *Mtb* (Supplementary Table 7). All of the tested compounds had MIC_{90} values ≤ 62.5 $\mu\text{g/ml}$ (Supplementary Table 8) against wild type *Mtb*. 010E was equipotent across strains tested while 007C was slightly more potent against drug-resistant strains compared with wild-type *Mtb*.

Target-based whole-cell screening

After the compounds were evaluated against *Mtb* in standard 7H9 broth to identify those with growth inhibitory activity, selected compounds were tested against a conditional knockdown mutant of *Mtb* H37Rv, *thyX* Tet-OFF, in which *thyX* is expressed under the control of a Tet-regulated promoter³⁵. In this target-based whole-cell assay, compounds with ThyX-selective activity in *Mtb* can be identified on the

basis of whether ATc-mediated depletion of ThyX confers hypersensitivity to the compound^{35, 39}. In accordance with previous findings³⁵, the positive control, 5-FU, showed a progressive, ATc-dependent shift in MIC_{90} from 3.1 μM in the absence of ATc to 0.3 μM at an ATc concentration of 6.2 ng/ml. Among the compounds tested in this assay, two were identified that showed ≥ 4 -fold increase in potency upon ThyX depletion, namely, E1 and idebenone (Fig. 6). E1 (Fig. 6A) and idebenone (Fig. 6B) showed the same activity against *thyX*

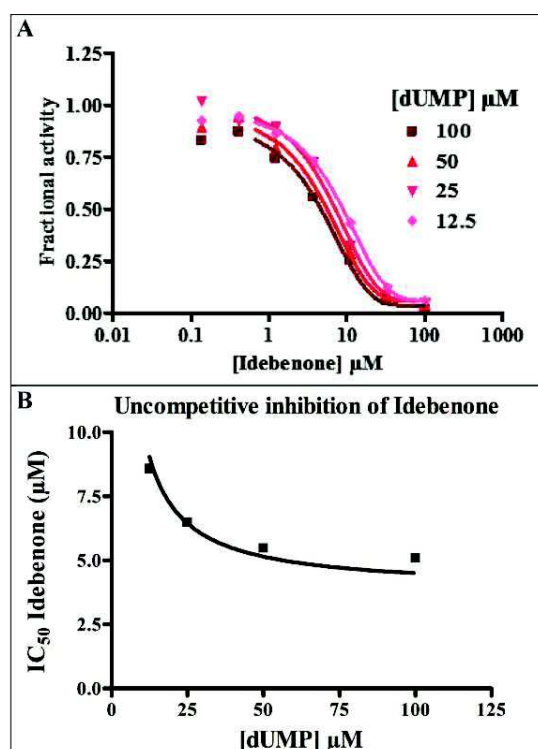


Figure 5: Idebenone dose response against ThyX and effect of dUMP. A) Idebenone dose response curves versus ThyX. B) Effect of the dUMP concentration on the IC_{50} value of Idebenone.

Tet-OFF in the absence of ATc as against the H37Rv control, with MIC_{90} values of 62.5 and 125 μM , respectively. In the case of the compound E1, addition of ATc resulted in a progressive increase in susceptibility to E1, with the MIC_{90} value decreasing to 15.6 μM at an ATc concentration of 6.2 ng/ml. ATc-mediated ThyX depletion also resulted in an increase in susceptibility to idebenone, with the MIC_{90} shifting ~ 5 -fold, from 125 μM to 22 μM . However, for reasons that are unclear, idebenone displayed atypical behaviour in the checkerboard assay compared to 5-FU (data not shown) and E1, showing $\sim 90\%$ growth inhibition over an unusually large concentration range (62.5 – 7.8 μM) when added to *thyX* Tet-OFF in the presence of ATc at 6.2 ng/ml (Fig. 6B). Of the other compounds tested, F2 showed a slight (~ 2 -fold) MIC_{90} shift (62.5 to 31.2 μM) in the presence of ATc at 6.2 ng/ml, whereas no shift in MIC_{90} was observed for B6, D4, D5, E10, F1, 007C, 007F and 010F. Together, these results suggest that E1 and idebenone show target selectivity against ThyX in *Mtb*.

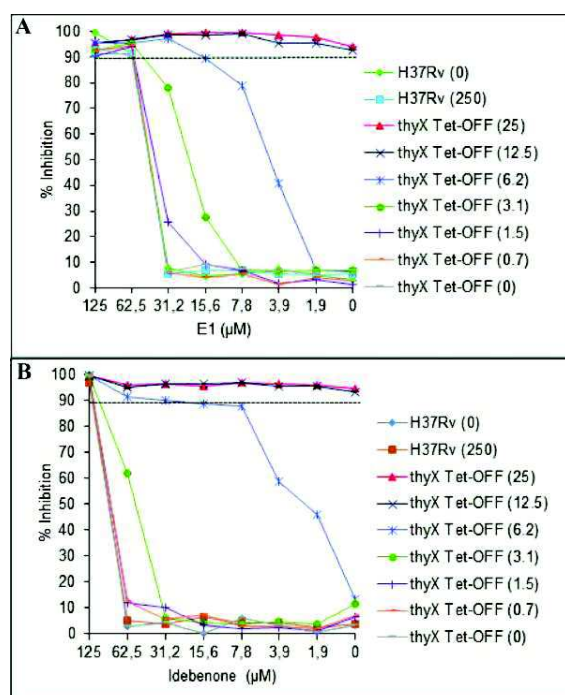


Figure 6: Depletion of ThyX in *Mtb* confers modest hypersensitivity to E1 and idebenone. The effect of ThyX depletion on the susceptibility to E1 and idebenone was assessed using the thyX Tet-OFF mutant in a checkerboard assay. The H37Rv strain was used as a control. Bacterial viability was assessed by the Alamar Blue assay, measuring fluorescence at 544/590 nm. The numbers in parentheses denote the concentration of anhydrotetracycline (ATC, ng/ml), which modulates the expression of thyX in thyX Tet-OFF (Singh et al., 2015). Ninety percent growth inhibition (MIC90) is represented by the dashed horizontal line. The results shown are representative of one of the three biological replicates.

DISCUSSION

We have used a combination of cheminformatics and experimental strategies to attempt to identify new inhibitors of *Mtb* ThyX and GyrB (Fig. 1). Many previous studies have shown that NQs possess activity against *Mtb*^{15-21, 24} and other bacteria²³. It has long been suggested that such quinones are reactive and generally non-specific⁴⁰, yet these natural products are already in therapeutic use, demonstrating that selective toxicity can be attained^{41, 42}. In this study we utilized NQs against two *Mtb* targets, namely ThyX and GyrB (Supplementary Table 1). Using a common feature pharmacophore approach we showed that while a small set of compounds had

identical pharmacophore features in each model, their arrangement was unique (Fig. 2). As we updated these models we noted little apparent change in the *Mtb* ThyX model and retrieved several compounds of interest for testing. However, the *Mtb* GyrB pharmacophore was unable to retrieve any additional active molecules containing NQ or other features (Supplementary Table 2). One of the active compounds identified as active against *Mtb* ThyX using a pharmacophore based on NQs was idebenone (Fig. 4 and 5), which demonstrates that our models can retrieve non-NQs as ThyX inhibitors. This is of interest from the point of view of target-based screening. Idebenone exhibited uncompetitive inhibition of *Mtb* ThyX with respect to dUMP binding. This reveals a different mode of action of idebenone against *Mtb* ThyX compared to that observed previously for NQs against the *PBCV-1* ThyX. This novel mode of action suggests that idebenone preferentially binds to *Mtb* ThyX-dUMP complex, and not only to the free enzyme as previously was observed for the *PBCV-1* enzyme²³. This mechanistic observation will require further elucidation in future work. Idebenone has recently completed a phase III clinical trial for Duchene Muscular Dystrophy⁴³. It is a potent antioxidant⁴⁴ and can donate electrons to complex III of the electron transport chain. Idebenone has also found utility in studies on mitochondrial diseases including Friedreich's Ataxia⁴⁵ and Leber's Optic Neuropathy⁴⁶. It is therefore likely that idebenone with a weak activity on *Mtb* whole cells could have potential for testing against additional diseases. We have also tested menadione and analogs in this study and while these have improved whole cell activity (Supplementary Table 5) compared to idebenone, the ThyX activity was completely inhibited in the presence of 100 μM menadione (K.D. H.B and H.M, unpublished data). Menadione was however inactive against *Mtb* gyrase. The addition of a hydroxyl to give 7-methyljuglone was equipotent against both *Mtb* ThyX and gyrase (Supplementary Table 1). This may indicate a key hydrogen bonding interaction may be a minimal interaction to provide dual activity for both ThyX and DNA gyrase.

As we tested and collected a large number of molecules (N = 94) against *Mtb* ThyX, we were able to use a machine learning approach. This approach has the advantage of identifying chemical features that may be important for activity and those which are less desirable. Clearly quinone and NQ substructures were identified and molecules with amines and sulfonamides were less desirable. These results could help us focus on compounds to test in the future and the Bayesian model has the advantage of being able to quickly score compounds. We evaluated the model with additional NQs (Supplementary Table 6). Our model predicted new *Mtb* ThyX inhibitors which had modest activity against *Mtb*, attesting to the utility of our approach. In addition we have used a second software tool (CDD Models) which produces a similar leave-out-cross-validation ROC value, with the advantage that this model can be shared openly with others. In future, new compounds could be scored with our previously published Bayesian models for whole cell activity³⁸ and the current *Mtb* ThyX Bayesian model to prioritize those for purchasing and testing

The compounds shown in Supplementary Table 4 had approximately a 10 fold range of whole-cell activity against *Mtb* and some of them partially target ThyX in *Mtb*. In this study we had greater success identifying additional inhibitors of *Mtb* ThyX than GyrB. While there is some inhibition overlap revealed by the NQs, this could suggest that the permissiveness of *Mtb* ThyX is greater than GyrB due to differences in the binding site interactions. Similarity searching for compounds previously identified in whole-cell screens against *Mtb* identified a NQ (B6) with *Mtb* ThyX activity (Fig. 3) and moderate antibacterial activity on *Mtb* (Supplementary Table 4). It suggests that in the future work it might be possible to obtain NQs with improved whole cell activity. Idebenone, while weakly active in whole cells could also be a starting point for structure based design by docking this into the crystal structure and modifying it to optimize interactions. The whole cell activity of idebenone could perhaps be increased by synthesis of new derivatives using our previous Bayesian models based on whole cell activity data³⁸. The progress of idebenone

in human clinical trials for Duchene Muscular Dystrophy suggests that it is likely acceptable from the point of view of physicochemical properties and safety.

Importantly, we showed the selectivity for ThyX in *Mtb* for two different compounds, namely E1 and idebenone, identified by *in vitro* screening against TB ThyX and virtual screening using the N18 pharmacophore model, respectively. This demonstrate that these molecules selectively inhibition of ThyX in living *Mtb* cells, resulting in bacterial death.

This study demonstrates the importance of natural products to help us understand the structure-activity relationships of two unrelated targets in *Mtb* and at the same time identify new lead compounds selective for ThyX for further optimization, some of which are also active against drug resistant *Mtb*.

Acknowledgements

H.M is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique. The work was partially supported by a grant from the European Community's Seventh Framework Program (grant 260872, MM4TB Consortium) to S.E., A.M. and V.M. Work in A.M.'s lab is also supported by grant BB/J004561/1 from BBSRC (UK) and the John Innes Foundation., and work in VM's laboratory by grants from the South African Medical Research Council and the National Research Foundation of South Africa. The CDD TB database was made possible with funding from the Bill and Melinda Gates Foundation (Grant#49852 "Collaborative drug discovery for TB through a novel database of SAR data optimized to promote data archiving and sharing"). The project described was supported by Award Number 2R42AI088893-02 from the NIH/NIAID. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the NIAID/NIH. Biovia is kindly acknowledged for providing Discovery Studio to S.E.

Author contributions

K.D., V.S., Y.B. performed *in vitro* experiments, analyzed results and wrote the paper. V.K., H.B., N.G.B., S.J.H., J.E.P., P.B. performed *in vitro* experiments. P.B.M., A.M., V.M. designed *in vitro* experiments and wrote the paper. H.M. designed the study, analyzed the results and wrote the paper. S.E. designed and performed *in silico* experiments, analyzed results and wrote the manuscript.

Competing financial interest

S.E. is a consultant for Collaborative Drug Discovery and Collaborations in Chemistry. AM

is a consultant for Inspiralis Ltd. The funder provided support in the form of salaries for authors [SE AM], but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Additional information

Supplementary information is available in the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.M. and S.E. (hannu.myllykallio@polytechnique.edu; ekinssean@yahoo.com)

ONLINE METHODS

Compounds

Tested compounds were purchased from ChemBridge, Vitas-M Laboratory Ltd., InterBioScreen or Sigma and were > 90% pure (see Supplementary file 1 for more details).

ThyX assay

Mtb ThyX activity was measured using the tritium release assay, as previously described for *Helicobacter pylori* ThyX²². Reaction mixture included 10 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 500 μM FAD, bovine serum albumin (200 μg/ml), 250 μM CH₂H₄folate (Eprova, Merck), 1 mM NADPH, 100 μM dUMP, [5H³]dUMP (Moravek Biochemicals, CA, USA) and 1 μM *Mtb* ThyX in 50 mM HEPES pH 8. DMSO concentration was maintained constant at 1%. Reactions were initiated by addition of NADPH (1 mM) at 37°C and were stopped after 7 mins. For idebenone, IC₅₀ value decreased as a function of increasing dUMP concentration indicating an un-competitive mode of inhibition. Therefore, the formula $IC_{50} = K_i * (1 + K_m/[S]) + [E]/2$ where K_m is the Michaelis constant for dUMP, [S] is the dUMP concentration, and [E] is the enzyme concentration in the assay, was used to convert a measured IC₅₀ value to the corresponding K_i .

GyrB assay

Mtb gyrase supercoiling assays were carried out as described previously⁴⁷. Each assay (30 μl) contained a range of gyrase concentrations (0.006–0.3 μM) and 0.5 μg of relaxed pBR322 in 40 mM Tris–HCl (pH 7.9), 25 mM KCl, 4 mM DTT, 0.1 mg/ml tRNA, 100 mM potassium glutamate, 0.36 mg/ml BSA, 6 mM magnesium acetate, 2 mM spermidine and 1 mM ATP. For IC₅₀ determinations, compounds, dissolved in DMSO, were included in supercoiling assays at a range of concentrations; the final DMSO concentration was kept <5%. Reactions were incubated at 37°C for 60 min. After the incubation, DNA was then prepared for electrophoresis by addition of an equal volume of chloroform:isoamylalcohol (24:1), brief vortexing, centrifugation and addition of 30 μl STEB [40% sucrose, 100 mM Tris–HCl (pH 8.0), 100 mM EDTA and 0.5 μg/ml

bromophenol blue]. The products were finally analyzed by electrophoresis on 1% agarose gels at 1 V/cm overnight and stained with ethidium bromide.

Whole cell *Mtb* testing

A resazurin (Alamar Blue) assay was used to assess activity against strains of *Mtb*⁴⁸. The antimicrobial susceptibility test was performed in a clear-bottomed, round well, 96-well microtiter plate. Compounds were tested at 8 concentrations ranging between 40 and 0.31 μg/mL with a final DMSO concentration of 1.25% in each well. After a growth medium containing ~10⁴ bacteria was added to each well, the different dilutions of compounds were added. Controls included wells containing concentrations of rifampin and isoniazid ranging from 0.00039 to 8.0 μg/mL to control for assay performance; wells with bacteria, growth medium, and vehicle (1.25% DMSO); and sterility control wells with medium. Plates were incubated at 37°C for 6 d in an ambient incubator at which time 5 μL of 1% resazurin dye was added to each well. After 2 days of incubation, visual inspection of color (pink, periwinkle or blue) was recorded for each well along with measurements of fluorescence in a microtiter plate fluorimeter with excitation at 530 nm and emission at 590 nm. The lowest drug concentration that inhibited growth of ≥90% of *Mtb* bacilli in the broth was considered the MIC₉₀ value⁴⁹. Rifampicin and isoniazid were used as positive controls and were consistently in the acceptable range.

Target-based whole-cell screening

The susceptibility of *Mtb* H37Rv and a conditional knockdown of ThyX in *Mtb*, *thyX* Tet-OFF, to a subset of test compounds was also determined by the broth microdilution method, as described previously³⁵. Briefly, bacteria were grown in Middlebrook 7H9 broth (BD) supplemented with OADC (BD), 0.2% glycerol and 0.05% Tween-80 to mid-exponential phase. The culture was diluted and ~10⁵ CFU/ml was added to a 96-well microtiter plate containing 2-fold serial dilutions of drug which was then incubated at 37°C. For the pairwise combination (anhydrotetracycline (ATc) vs. test compound) assay using the *thyX* Tet-OFF strain, a two-

dimensional array of serial dilutions of ATc and the test compound was prepared in a 96-well plate. Control wells consisting of bacteria only or medium only were treated with the same concentration of DMSO as used in drug-containing wells. At day 7, 10 μ l of Alamar Blue solution (Invitrogen) was added and plates were reincubated at 37°C. After 24h, fluorescence (excitation 544 nm; emission 590 nm) was measured in a FLUOstar OPTIMA plate reader (BMG LABTECH, Offenberg, Germany). Data were normalised to the minimum and maximum inhibition controls to generate a dose response curve (% inhibition) from which the MIC₉₀ was determined.

Similarity searching

The CDD database (Collaborative Drug Discovery Inc. Burlingame, CA) has been described previously and applied for TB research³⁸. The literature data on *Mtb* drug discovery has been curated and 26 *Mtb* specific datasets (including published data from high throughput screens performed by NIAID/Southern Research Institute have been compiled in the CDD Public database) are hosted, representing over 350,000 compounds derived from patents, literature and HTS data, and we have termed this the CDD TB DB. The NQ substructure was used to query these NIAID/Southern Research Institute data. Molecules which showed previously published good whole-cell activity (MIC₉₀) were selected for testing. The data generated in this study were collected and uploaded in the CDD private Vault (<http://www.collaborativedrug.com/register>) from sdf files and mapped to custom protocols.

Common features pharmacophores

A set of NQs (Table 1) was used to build common features pharmacophores for *Mtb* ThyX and GyrB with Discovery Studio 4.1 (Biovia, San Diego, CA) from 3D conformations of the

molecules generated with the CAESAR algorithm. This identified key features for each protein. The pharmacophores were then used to search various databases (for which up to 100 molecule conformations with the FAST conformer generation method with the maximum energy threshold of 20 kcal/mol, were created) such as the NIH clinical drugs set containing over 700 molecules. The pharmacophore models were updated as additional data were generated.

Bayesian models

We have previously described the generation and validation of the Laplacian-corrected Bayesian classifier models for *Mtb*³⁸ using Discovery Studio 3.5 (San Diego, CA). The models were all generated using the following molecular descriptors: molecular function class fingerprints of maximum diameter 6 (FCFP₆), AlogP, molecular weight, number of rotatable bonds, number of rings, number of aromatic rings, number of hydrogen bond acceptors, number of hydrogen bond donors, and molecular fractional polar surface area which were all calculated from input sdf files. This approach was applied to the ThyX data generated in this study using the cut off of 70% inhibition at 100 μ M to define actives. The resulting models were also validated using leave-one-out cross-validation; 5-fold validation to generate the receiver operator curve area under the curve (ROC AUC); concordance; specificity, and selectivity, as described previously. In the current study, as well as using the datasets individually, we also combined the datasets. Bayesian models were also generated in the CDD Vault using CDD Models, as described previously⁵⁰. The current implementation used the FCFP6 fingerprints alone, and by default 3-fold cross-validation is performed. The model can also be exported from CDD Vault for use in other open source software and mobile apps⁵⁰.

References

1. Lonroth, K. *et al.* Towards tuberculosis elimination: an action framework for low-incidence countries. *Eur Respir J* 45, 928-952 (2015).
2. Jakab, Z., Acosta, C.D., Kluge, H.H. & Dara, M. Consolidated Action Plan to Prevent and Combat Multidrug- and Extensively Drug-resistant Tuberculosis in the WHO European Region 2011-2015: Cost-effectiveness analysis. *Tuberculosis (Edinb)* (2015).
3. Zhang, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 529-564 (2005).
4. Ballel, L., Field, R.A., Duncan, K. & Young, R.J. New small-molecule synthetic antimycobacterials. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 2153-2163 (2005).
5. Zumla, A.I. *et al.* New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis* 14, 327-340 (2014).
6. Maddy, J.A. *et al.* Antituberculosis activity of the molecular libraries screening center network library. *Tuberculosis (Edinb)* 89, 354-363 (2009).
7. Ananthan, S. *et al.* High-throughput screening for inhibitors of Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Tuberculosis (Edinb)* 89, 334-353 (2009).
8. Reynolds, R.C. *et al.* High throughput screening of a library based on kinase inhibitor scaffolds against Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Tuberculosis (Edinb)* 92, 72-83 (2012).
9. Manjunatha, U.H. & Smith, P.W. Perspective: Challenges and opportunities in TB drug discovery from phenotypic screening. *Bioorg Med Chem* (2014).
10. Andries, K. *et al.* A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science* 307, 223-227 (2005).
11. Ekins, S., Freundlich, J.S., Choi, I., Sarker, M. & Talcott, C. Computational Databases, Pathway and Cheminformatics Tools for Tuberculosis Drug Discovery. *Trends in Microbiology* 19, 65-74 (2011).
12. Kana, B.D., Karakousis, P.C., Parish, T. & Dick, T. Future target-based drug discovery for tuberculosis? *Tuberculosis (Edinb)* 94, 551-556 (2014).
13. Sarker, M. *et al.* Combining cheminformatics methods and pathway analysis to identify molecules with whole-cell activity against Mycobacterium tuberculosis. *Pharm Res* 29, 2115-2127 (2012).
14. Ekins, S.E. *et al.* Combining Metabolite-Based Pharmacophores with Bayesian Machine Learning Models for Mycobacterium tuberculosis Drug Discovery. *PLOS ONE* In Press (2015).
15. Lall, N. & Meyer, J.J. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of Mycobacterium tuberculosis by ethnobotanically selected South African plants. *J Ethnopharmacol* 66, 347-354 (1999).
16. Lall, N. & Meyer, J.J. Antibacterial activity of water and acetone extracts of the roots of Euclea natalensis. *J Ethnopharmacol* 72, 313-316 (2000).
17. Lall, N. & Meyer, J.J. Inhibition of drug-sensitive and drug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis by diospyrin, isolated from Euclea natalensis. *J Ethnopharmacol* 78, 213-216 (2001).
18. van der Kooy, F., Meyer, J.J. & Lall, N. Antimycobacterial activity and possible mode of action of newly isolated neodiospyrin and other naphthoquinones from Euclea natalensis. *South African Journal of Botany* 72, 349-352 (2006).
19. Mahapatra, A. *et al.* Activity of 7-methyljuglone derivatives against Mycobacterium tuberculosis and as subversive substrates for mycothiol disulfide reductase. *Bioorg Med Chem* 15, 7638-7646 (2007).
20. Dey, D., Ray, R. & Hazra, B. Antitubercular and antibacterial activity of

- quinonoid natural products against multi-drug resistant clinical isolates. *Phytother Res* 28, 1014-1021 (2014).
21. Tran, T. *et al.* Quinones as antimycobacterial agents. *Bioorg Med Chem* 12, 4809-4813 (2004).
 22. Skouloubris, S. *et al.* Targeting of *Helicobacter pylori* thymidylate synthase ThyX by non-mitotoxic hydroxy-naphthoquinones. *Open Biol* 5 (2015).
 23. Basta, T. *et al.* Mechanistic and structural basis for inhibition of thymidylate synthase ThyX. *Open Biol* 2, 120120 (2012).
 24. Karkare, S. *et al.* The naphthoquinone diospyrin is an inhibitor of DNA gyrase with a novel mechanism of action. *J Biol Chem* 288, 5149-5156 (2013).
 25. Warner, D.F., Evans, J.C. & Mizrahi, V. Nucleotide Metabolism and DNA Replication. *Microbiol Spectr* 2 (2014).
 26. Myllykallio, H. *et al.* An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis. *Science* 297, 105-107 (2002).
 27. Koehn, E.M. *et al.* An unusual mechanism of thymidylate biosynthesis in organisms containing the thyX gene. *Nature* 458, 919-923 (2009).
 28. Becker, H.F. *et al.* Substrate interaction dynamics and oxygen control in the active site of thymidylate synthase ThyX. *Biochem J* 459, 37-45 (2014).
 29. Leduc, D. *et al.* Flavin-dependent thymidylate synthase ThyX activity: implications for the folate cycle in bacteria. *J Bacteriol* 189, 8537-8545 (2007).
 30. Fivian-Hughes, A.S., Houghton, J. & Davis, E.O. Mycobacterium tuberculosis thymidylate synthase gene thyX is essential and potentially bifunctional, while thyA deletion confers resistance to p-aminosalicylic acid. *Microbiology* 158, 308-318 (2012).
 31. Hunter, J.H., Gujjar, R., Pang, C.K. & Rathod, P.K. Kinetics and ligand-binding preferences of Mycobacterium tuberculosis thymidylate synthases, ThyA and ThyX. *PLoS One* 3, e2237 (2008).
 32. Sampathkumar, P. *et al.* Structure of the Mycobacterium tuberculosis flavin dependent thymidylate synthase (MtbThyX) at 2.0Å resolution. *J Mol Biol* 352, 1091-1104 (2005).
 33. Kogler, M. *et al.* Synthesis and evaluation of 6-aza-2'-deoxyuridine monophosphate analogs as inhibitors of thymidylate synthases, and as substrates or inhibitors of thymidine monophosphate kinase in Mycobacterium tuberculosis. *Chem Biodivers* 9, 536-556 (2012).
 34. Kogler, M. *et al.* Synthesis and evaluation of 5-substituted 2'-deoxyuridine monophosphate analogues as inhibitors of flavin-dependent thymidylate synthase in Mycobacterium tuberculosis. *J Med Chem* 54, 4847-4862 (2011).
 35. Singh, V. *et al.* The complex mechanism of antimycobacterial action of 5-fluorouracil. *Chem Biol* 22, 63-75 (2015).
 36. Maxwell, A. & Lawson, D.M. The ATP-binding site of type II topoisomerases as a target for antibacterial drugs. *Curr Top Med Chem* 3, 283-303 (2003).
 37. Bush, N.G., Evans-Roberts, K. & Maxwell, A. DNA Topoisomerases, in *In EcoSal—Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. (eds. A. Böck *et al.*) (ASM Press, Washington DC; 2015).
 38. Ekins, S. *et al.* Bayesian Models Leveraging Bioactivity and Cytotoxicity Information for Drug Discovery. *Chem Biol* 20, 370-378 (2013).
 39. Abrahams, G.L. *et al.* Pathway-selective sensitization of Mycobacterium tuberculosis for target-based whole-cell screening. *Chem Biol* 19, 844-854 (2012).
 40. Kumagai, Y., Shinkai, Y., Miura, T. & Cho, A.K. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52, 221-247 (2012).

41. Schuck, D.C. *et al.* Biological evaluation of hydroxynaphthoquinones as anti-malarials. *Malar J* 12, 234 (2013).
42. Wang, S.H. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Lipophilic 1,4-Naphthoquinone Derivatives against Human Cancer Cell Lines. *Molecules* 20, 11994-12015 (2015).
43. Buyse, G.M. *et al.* Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 385, 1748-1757 (2015).
44. Erb, M. *et al.* Features of idebenone and related short-chain quinones that rescue ATP levels under conditions of impaired mitochondrial complex I. *PLoS One* 7, e36153 (2012).
45. Arpa, J. *et al.* Triple therapy with darbepoetin alfa, idebenone, and riboflavin in Friedreich's ataxia: an open-label trial. *Cerebellum* 12, 713-720 (2013).
46. Iyer, S. Novel therapeutic approaches for Leber's hereditary optic neuropathy. *Discov Med* 15, 141-149 (2013).
47. Karkare, S., Yousafzai, F., Mitchenall, L.A. & Maxwell, A. The role of Ca(2)(+) in the activity of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase. *Nucleic Acids Res* 40, 9774-9787 (2012).
48. Palomino, J.C. *et al.* Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2720-2722 (2002).
49. Collins, L. & Franzblau, S.G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1004-1009 (1997).
50. Clark, A.M. *et al.* Open source bayesian models: 1. Application to ADME/Tox and drug discovery datasets. *J Chem Inf Model* 55, 1231-1245 (2015).

Manuscript in preparation

Supplementary Materials

Molecules targeted towards ThyX in *Mycobacterium tuberculosis*

Kamel Djaout¹, Vinayak Singh², Yap Boum³, Victoria Katawera³, Hubert Becker¹,
Natassja G. Bush⁴, Stephen J. Hearnshaw^{4,¶}, Jennifer E. Pritchard^{4,§}, Pauline Bourbon⁵
Peter B. Madrid⁵, Anthony Maxwell⁴, Valerie Mizrahi², Hannu Myllykallio^{1*} & Sean
Ekins^{6,7,*}

¹Laboratoire d'Optique et Biosciences - CNRS/INSERM, Département d'Enseignement-
Recherche de Biologie - Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau – France.

²MRC/NHLS/UCT Molecular Mycobacteriology Research Unit & DST/NRF Centre of
Excellence for Biomedical TB Research, Institute of Infectious Diseases and Molecular
Medicine and Division of Medical Microbiology, Faculty of Health Sciences, University of
Cape Town, AnzioRoad, Observatory 7925, Rondebosch, Cape Town 7700, South Africa.

³Epicentre Mbarara Research Base, Microbiology Department, Faculty of Medicine,
Mbarara University of Science and Technology, Uganda.

⁴Department of Biological Chemistry, John Innes Centre, Norwich Research Park,
Norwich NR4 7UH, UK.

⁵SRI International, 333 Ravenswood Avenue, Menlo Park, CA 94025, USA.

⁶Collaborative Drug Discovery, 1633 Bayshore Highway, Suite 342, Burlingame, CA 94403, USA

⁷Collaborations in Chemistry, 5616 Hilltop Needmore Road, Fuquay-Varina, NC 27526, USA.

Present addresses:

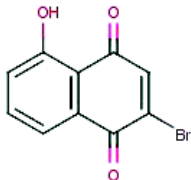
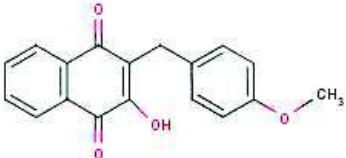
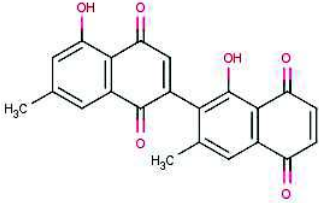
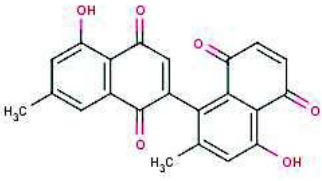
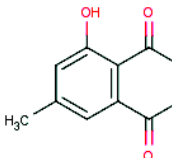
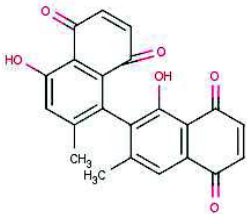
[†]Stephen Hearnshaw, Inspiralis Ltd., Norwich Biocubator, Norwich Research Park, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK

[§]Jennifer Pritchard, Birkbeck College, Univ. London WC1E 7HX, UK


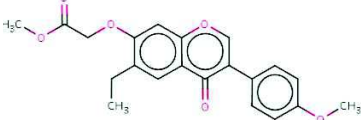
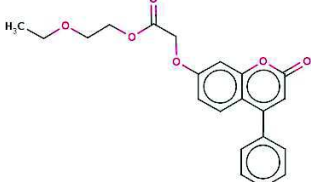
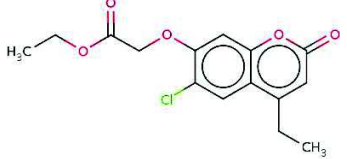
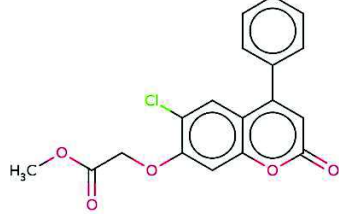
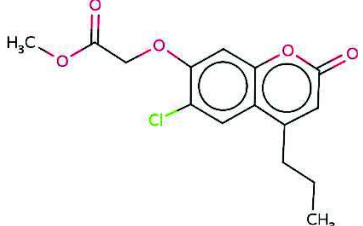
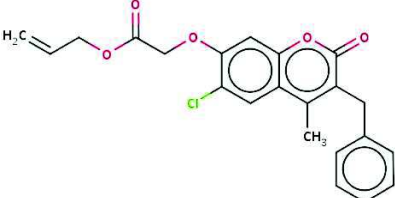
Running Head: ThyX and GyrB models for Mtb


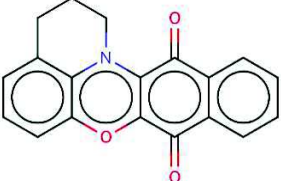
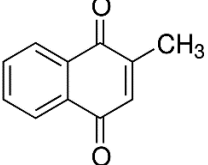
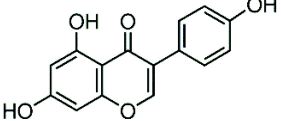
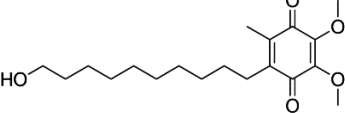
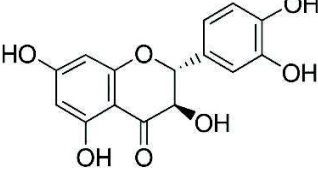

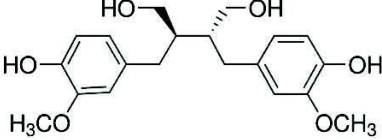
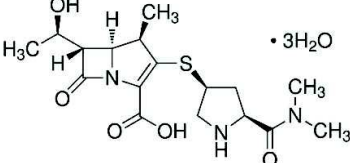
Key words: Bayesian models; Cheminformatics; thymidylate synthase ThyX, GyrB, Machine learning; *Mycobacterium tuberculosis*; Pharmacophore; naphthoquinones

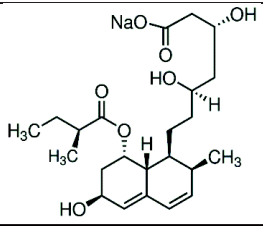
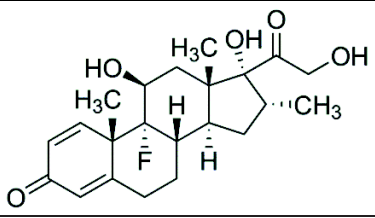
Supplementary Table 1. Initial molecules used for generating pharmacophores for ThyX and GyrB

Compound	Structure	IC ₅₀ gyrase	IC ₅₀ ThyX
2E04		>50 μM	5 μM
C8-C1		No inhibition	4.5 μM
Diospyrin		15 μM	No inhibition
Neodiospyrin		50 μM	20 μM
7-methyljuglone		30 μM	35 μM
Isodiospyrin		100 μM	n.d.

Supplementary Table 2. Compounds with no activity against gyrase at 100 μ M

Chemical name	Chemical structure
benzyl [(4-butyl-6-chloro-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy]acetate	
methyl {[6-ethyl-3-(4-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-chromen-7-yl]oxy}acetate	
2-ethoxyethyl [(2-oxo-4-phenyl-2H-chromen-7-yl)oxy]acetate	
ethyl [(6-chloro-4-ethyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy]acetate	
methyl [(6-chloro-2-oxo-4-phenyl-2H-chromen-7-yl)oxy]acetate	
methyl [(6-chloro-2-oxo-4-propyl-2H-chromen-7-yl)oxy]acetate	
prop-2-en-1-yl 2-[(3-benzyl-6-chloro-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)oxy]acetate	

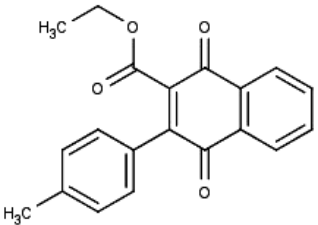
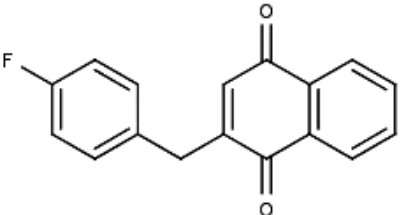
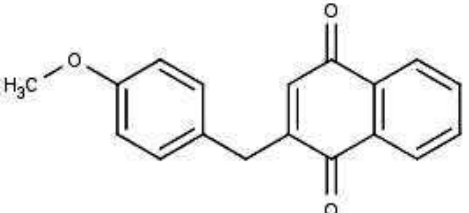
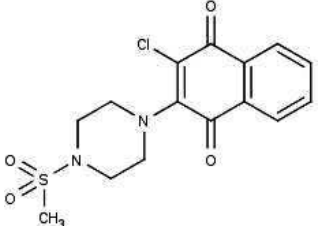
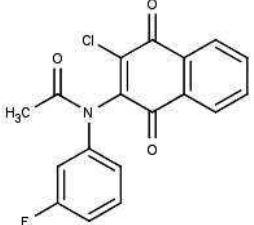
<p>3-(3-allyl-2-imino-4-oxo-1,3-thiazolidin-5-ylidene)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one</p>	
<p>2,3-dihydro-1H-Tbenzo[b]pyrido[3,2,1-kl]phenoxazine-8,13-dione</p>	
<p>Menadione</p>	
<p>Genistein</p>	
<p>Idebenone</p>	
<p>Taxifolin</p>	
<p>ethyl 3-(4-methylphenyl)-1,4-dioxonaphthalene-2-carboxylate (BILAN B6)</p>	
<p>SECOISOLARICIRESINOL</p>	
<p>MEROPENEM</p>	

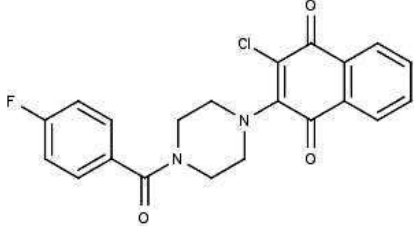
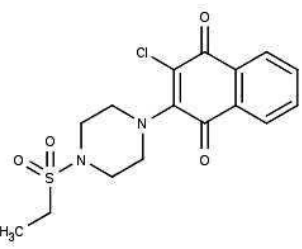
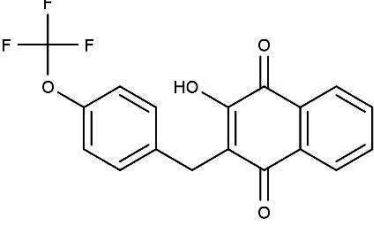
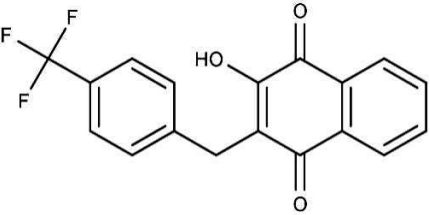
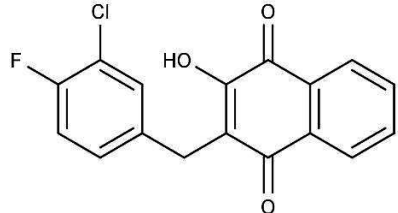
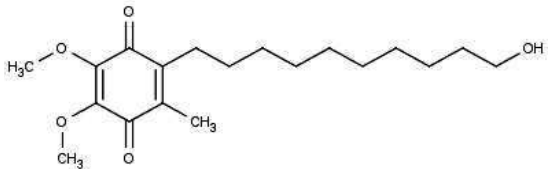
<p>PRAVASTATIN</p>	 <p>The chemical structure of Pravastatin sodium salt is shown. It features a hexahydronaphthalene core with a hydroxyl group at C-3, a methyl group at C-4, and a methyl group at C-8. At C-2, there is a side chain consisting of a propyl group with a methyl branch at the beta position, linked via an ester bond to a 3-hydroxy-3-phenylpropanoate moiety. The sodium salt is formed from the carboxylic acid group of this moiety.</p>
<p>Dexamethasone</p>	 <p>The chemical structure of Dexamethasone is shown. It is a corticosteroid with a four-ring steroid nucleus. It has a ketone group at C-3, a hydroxyl group at C-11, a methyl group at C-10, a fluorine atom at C-9, a methyl group at C-13, and a methyl group at C-14. At C-17, there is a side chain consisting of a methyl group, a hydroxyl group, and a 2-hydroxyethyl group.</p>

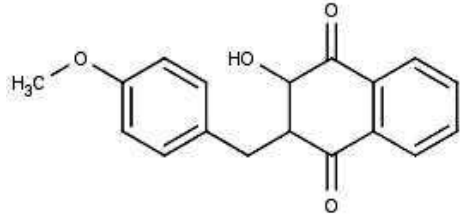
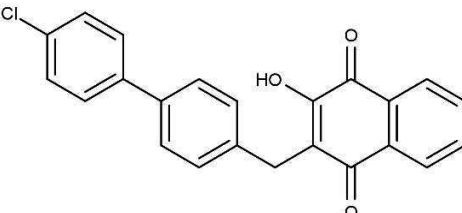
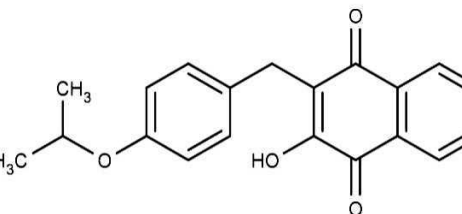
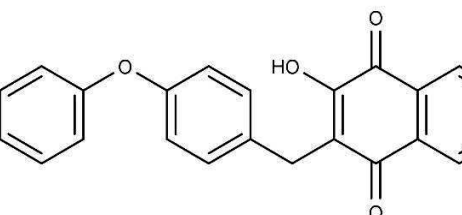
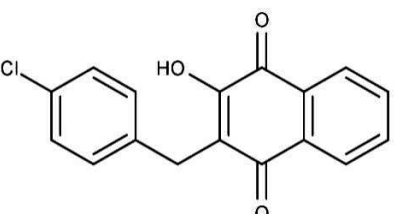
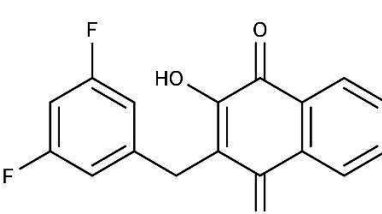
Supplementary Table 3. Molecules in ThyX model with 18 molecules

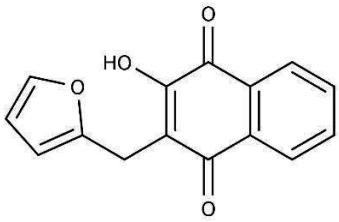
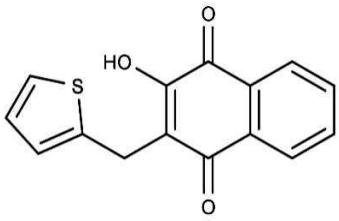
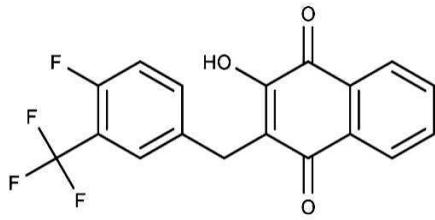
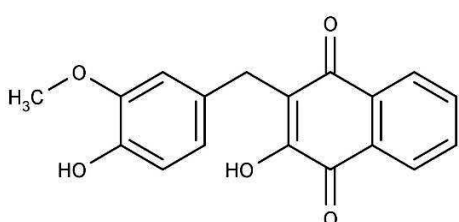
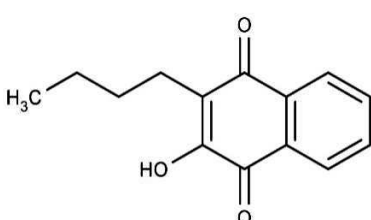
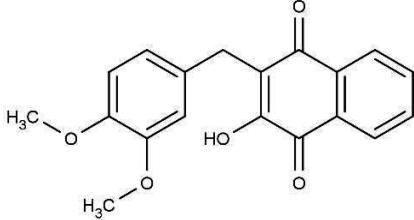
Molecule Smiles	Identifier	Principal	Max omit features
<chem>Oc1cccc2C(=O)C(=CC(=O)c12)Br</chem>	cpd1	2	0
<chem>COc1ccc(CC2=C(O)C(=O)c3ccccc3C2=O)cc1</chem>	cpd2	2	0
<chem>Cc1cc(O)c2C(=O)C=C(C(=O)c2c1)c3c(C)cc4C(=O)C=CC(=O)c4c3O</chem>	cpd3	0	0
<chem>Cc1cc(O)c2C(=O)C=C(C(=O)c2c1)c3c(C)cc(O)c4C(=O)C=CC(=O)c34</chem>	cpd4	1	0
<chem>Cc1cc(O)c2C(=O)C=CC(=O)c2c1</chem>	cpd5	1	0
<chem>CCN(CC)c1ccc(NC2=C(Cl)C(=O)c3ccccc3C2=O)cc1</chem>	cpd7	0	0
<chem>CCOC(=O)C1=C(C(=O)c2ccccc2C1=O)c3ccc(C)cc3</chem>	cpd8	2	0
<chem>CC(=O)c1c(C)[n+][O-]c2ccccc2[n+][O-]</chem>	cpd9	0	0
<chem>[O-][n+][c1ccccc1[n+][O-]]c3ccccc3</chem>	cpd10	0	0
<chem>CC(=O)c1c(C)[n+][O-]c2cc(Cl)c(Cl)cc2[n+][O-]</chem>	cpd11	0	0
<chem>O=C1C2=C(N3CCc4cccc(O2)c34)C(=O)c5ccccc15</chem>	cpd12	0	0
<chem>CCCCC1=CC(=O)Oc2cc(OCC(=O)OCc3ccccc3)c(Cl)cc12</chem>	6661898	0	0
<chem>CCc1ccc(cc1)C2=COc3cc(OCC(=O)OC)c(CC)cc3C2=O</chem>	6939246	0	0
<chem>CCOCCOC(=O)COc1ccc2C(=CC(=O)O)c2c1)c3ccccc3</chem>	6970845	0	0
<chem>CCOC(=O)COc1cc2OC(=O)C=C(CC)c2cc1Cl</chem>	6653343	0	0
<chem>COC(=O)COc1cc2OC(=O)C=C(c3ccccc3)c2cc1Cl</chem>	5618162	0	0
<chem>CCCC1=CC(=O)Oc2cc(OCC(=O)OC)c(Cl)cc12</chem>	5753116	0	0
<chem>CC1=C(Cc2ccccc2)C(=O)Oc3cc(OCC(=O)OCC=C)c(Cl)cc13</chem>	7105644	0	0

Supplementary Table 4. Anti-tubercular activities of compounds identified by various virtual screening methods

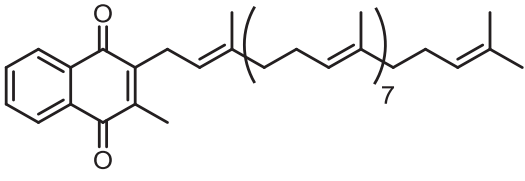
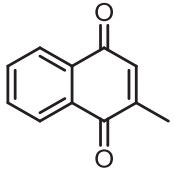
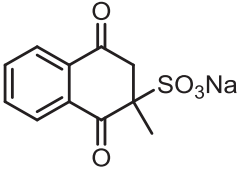
Name	Structure	MIC ₉₀ (μM) against H37Rv	MIC ₉₀ (μg/ml) against H37Rv
B6		62.5	20
D4		31.2	8.3
D5		62.5	17.4
E1		62.5	22.1
E10		31.2	10.7

F1		31.2	12.4
F2		31.2	11.5
007C		31.2	10.8
007F		31.2	10.3
010F		31.2	9.8
Idebenone		125.0	42.3

007A		53.0	15.6
007B		20.8	7.8
007D		96.7	31.2
007G		175.5	62.5
010A		52.2	15.6
010B		103.9	31.2

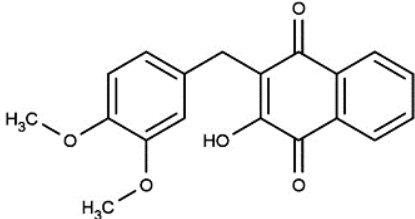
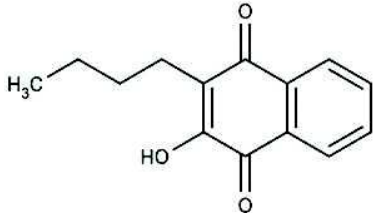
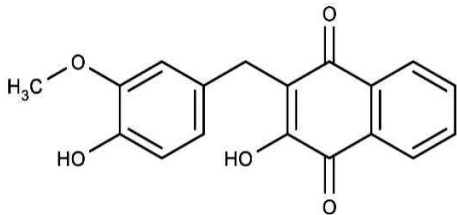
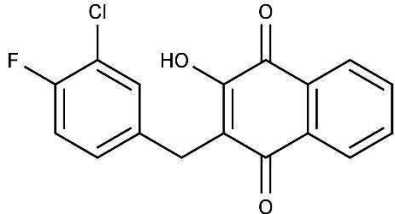
010C		245.8	62.5
010D		231.2	62.5
010E		22.2	7.8
010H		201.4	62.5
010I		135.4	31.2
010K		192.7	62.5

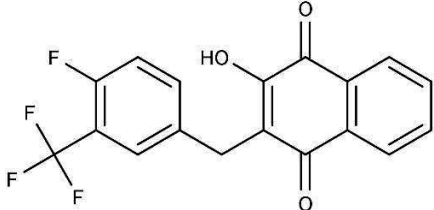
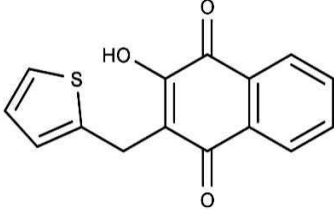
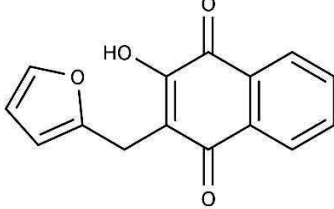
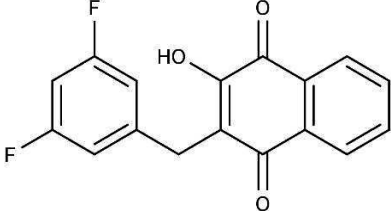
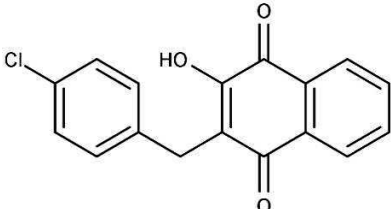
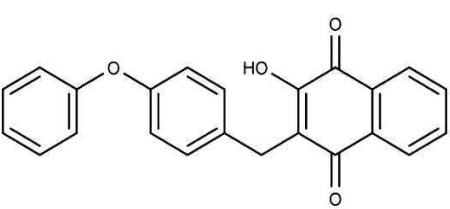
Supplementary Table 5. *Mtb* growth inhibitory activities of menadione analogs. *5 $\mu\text{g/ml}$ was the highest concentration soluble in 7H9 media with 1% ethanol as a co-solvent.

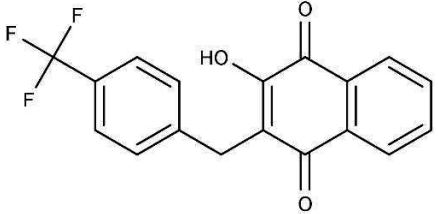
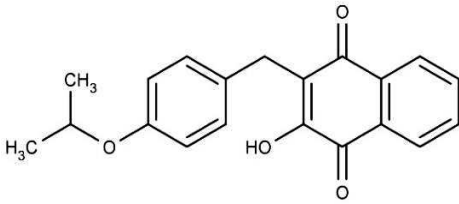
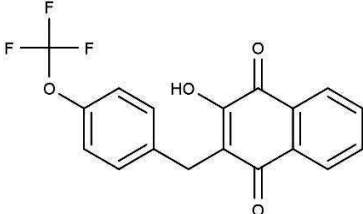
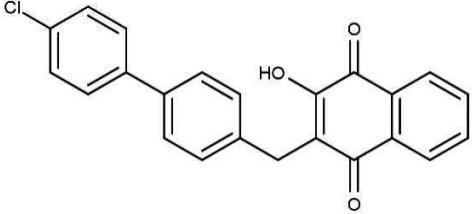
Molecule	Structure	MIC (H37Rv) $\mu\text{g/ml}$
MK-9		>5*
Menadione		17
Menadione Bisulfate		86

Supplementary Table 6. Bayesian scores and experimental results for NQs in a test set.

a = Bayesian score, higher values are better, b = scores greater than 3.399 = active, c = closest distance to compounds in training set, d = actual measured data. Note that higher Bayesian scores based on the features in each molecule scored as active or inactive predict more reliably inhibition.

Structure	Code	Bayesian Score ^a	Prediction for activity ^b	Closest distance ^c	% of ThyX inhibition at 100 μ M ^d
	010K	5.23	TRUE	0.56	42
	010I	1.88	FALSE	0.16	58
	010H	3.89	TRUE	0.62	41
	010F	8.6	TRUE	0.44	73

	010E	7.81	TRUE	0.44	32
	010D	3.68	TRUE	0.67	42
	010C	2.72	FALSE	0.62	60
	010B	6.18	TRUE	0.44	68
	010A	10.13	TRUE	0.45	64
	007G	5.73	TRUE	0.59	89

	007F	7.37	TRUE	0.45	74
	007D	8.28	TRUE	0.50	71
	007C	8.23	TRUE	0.57	78
	007B	6.48	TRUE	0.66	21

Supplementary Table 7. Strains used to test the whole-cell activity of the NQs in the test set for the Bayesian model.

Strain	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		Resistance
	RMP	INH	
H37Rv	<0.25	<0.125	none
MT 182	1.0	<0.125	RMP
TC 12561	4	2	RMP+ INH
TH 12526	<0.25	<0.125	none
TH12768	<0.25	0.5	INH

RMP- rifampicin, INH- isoniazid, RMP MIC is 0.5 $\mu\text{g/ml}$ and INH MIC is 0.25 $\mu\text{g/ml}$ ^[21]

Supplementary Table 8. Antibacterial activities of the fourteen NQs in the test set.

Compound	MIC/MBC ($\mu\text{g/ml}$)				
	H37Rv	MT 182	TC 12561	TH 12526	TH 12768
010A	15.625	31.25	15.625	15.625	31.25
007B	7.8125	31.25	31.25	15.625	15.625
010B	31.25	31.25	31.25	31.25	15.625
007C	31.25	15.625	15.625	15.625	15.625
010C	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5
007D	31.25	31.25	31.25	31.25	31.25
010D	62.5	125	15.625	62.5	62.5
010E	7.8125	7.8125	7.8125	7.8125	7.8125
007F	31.25	31.25	15.625	15.625	31.25
010F	62.5	31.25	15.625	31.25	62.5
007G	62.5	31.25	31.25	31.25	62.5
010H	62.5	31.25	62.5	62.5	62.5
010I	31.25	31.25	62.5	15.625	31.25
010K	62.5	125	62.5	15.625	62.5

Nous avons d'une part identifié de nouveaux inhibiteurs de ThyX *Mtb* et construit les modèles pharmacophores successifs ainsi que le modèle bayésien d'inhibition de ThyX *Mtb*. Un de ces modèles a par la suite été utilisé pour classer *in silico* la collection clinique de la NIH (National Institute of Health). Cette collection se compose de molécules en étude clinique pour le traitement de différentes affections. Ce sont donc des composés pour lesquels les propriétés ADME-tox (Absorption Distribution Métabolisme Excrétion Toxicité) ont été étudiées et sont acceptables.

De cette manière, nous avons identifié l'idebenone, une quinone en phase 3 d'essai clinique pour le traitement de la myopathie de Duchenne, comme un probable inhibiteur de ThyX. Le test *in vitro* de cette molécule sur l'activité de ThyX *Mtb* a confirmé les prédictions du modèle. L'idebenone présente une constante d'inhibition de 3.3 μM sur ThyX *Mtb*, et une MIC₉₀ de 125 μM sur la souche de référence H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.

Afin qu'elle puisse jouer le rôle d'antibactérien, une molécule doit inhiber sa cible essentielle dans les conditions physiologiques, c'est-à-dire *in vivo*. Nous avons par conséquent tenté d'observer l'inhibition de ThyX directement dans *Mtb*. Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Pr. Valérie Mizrahi à l'université de Cape Town (Afrique du Sud). Nos collaborateurs ont construit une souche de *Mtb* dans laquelle le gène *thyX* est placé en aval d'un promoteur Tet-OFF. Dans cette construction, le promoteur

Tet-OFF est activé par un facteur de transcription. Le facteur de transcription devient inactif en présence d'anhydrotetracycline (ATc), induisant la repression indirecte de l'expression de *thyX*. Cette construction permet donc, en augmentant la concentration du régulateur, ATc, de diminuer l'expression du gène *thyX*, et donc la quantité de ThyX *in vivo* (contrôlée par western blot, [129]). Si une molécule cible ThyX *in vivo* dans *Mtb*, la déplétion graduelle de ThyX devrait entraîner une sensibilisation de la souche à ce composé (diminution de la MIC).

Une gamme de concentration de répresseur a donc été croisée avec une gamme de concentration d'inhibiteur de ThyX *Mtb in vitro*, et la sensibilisation de la souche aux molécules a été estimée par le décalage de la MIC₉₀ en fonction de la concentration en ATc. De cette manière, nous montrons que la MIC₉₀ décroît d'un facteur 4 et 5 fois pour E1 et l'idebenone respectivement, lorsque la concentration en ATc dans le test est 6,25 ng/ml. Ces résultats montrent que ces deux molécules sont sélectives pour ThyX dans la bactérie pathogène, *Mtb*.

Ainsi, notre modèle pharmacophore a permis de sélectionner l'idebenone, une quinone (pas naphthoquinone), non toxique, qui inhibe ThyX *Mtb in vitro* et *in vivo*.

Enfin, l'ensemble de nos criblage ont permis de construire un modèle bayésien d'inhibition de ThyX avec comme seuil 70% d'inhibition à 100 µM. Il permet de prédire les bons et mauvais groupements associés à une inhibition (ou

pas) de ThyX *Mtb*. Ce dernier modèle s'ajuste avec les données expérimentales *in vitro* avec un coefficient de corrélation de 0.78. Afin de le valider, nous l'avons utilisé pour prédire l'activité de 14 naphthoquinones. Deux de ces molécules étaient prédites comme inactives et six d'entre elles présentaient plus 70% d'inhibition à 100µM, en accord avec les prédictions du modèle.

4.3 Discussion

Au début de ce projet, les inhibiteurs de type naphthoquinone avaient été développés au laboratoire sur la ThyX modèle, ThyX *PBCV-1*. La molécule lead C8C1 (Fig. 4-24) est un inhibiteur compétitif de la fixation du dUMP sur ThyX *PBCV-1* avec une constante d'inhibition de 300 nM.

4.3.1 Inhibition de ThyX *Mtb* par C8C1

Notre objectif était d'optimiser les naphthoquinones drug-like afin de disposer d'inhibiteurs de ThyX avec un pouvoir antimycobactérien. Cependant, C8C1, et une série de variant (Fig. 4-4) n'ont présenté qu'un effet modéré sur ThyX *Mtb*. C8C1 par exemple présente une constante d'inhibition sur ThyX *Mtb* de 220 µM. Cette différence est spécifique à la ThyX de *Mtb*, car nous avons par ailleurs montré que ces molécules inhibaient spécifiquement la ThyX de *Helicobacter pylori* (Annexe 1), et présentaient un effet antibactérien dans un modèle murin d'infection [76], validant par la même occasion notre stratégie de cibler ThyX pour le développement d'antibiotiques.

Dans un premier temps, nous avons entrepris de caractériser l'effet de ces molécules sur ThyX *Mtb* par spectroscopie à l'équilibre et résolue en temps, ainsi que par enzymologie. De cette manière, nous avons montré que les 2-OH-1,4-naphthoquinones ne ciblent pas le site de fixation du dUMP dans ThyX *Mtb*. Une étude approfondie nous a montré que ces molécules se fixaient préférentiellement au complexe ThyX-dUMP et que leur effet inhibiteur n'était pas lié à leur réactivité d'oxydoréduction.

Nous avons établi que si C8C1 est en compétition avec le dUMP pour le site actif de ThyX *PBCV-1*, il ne cible pas ce site dans ThyX *Mtb*.

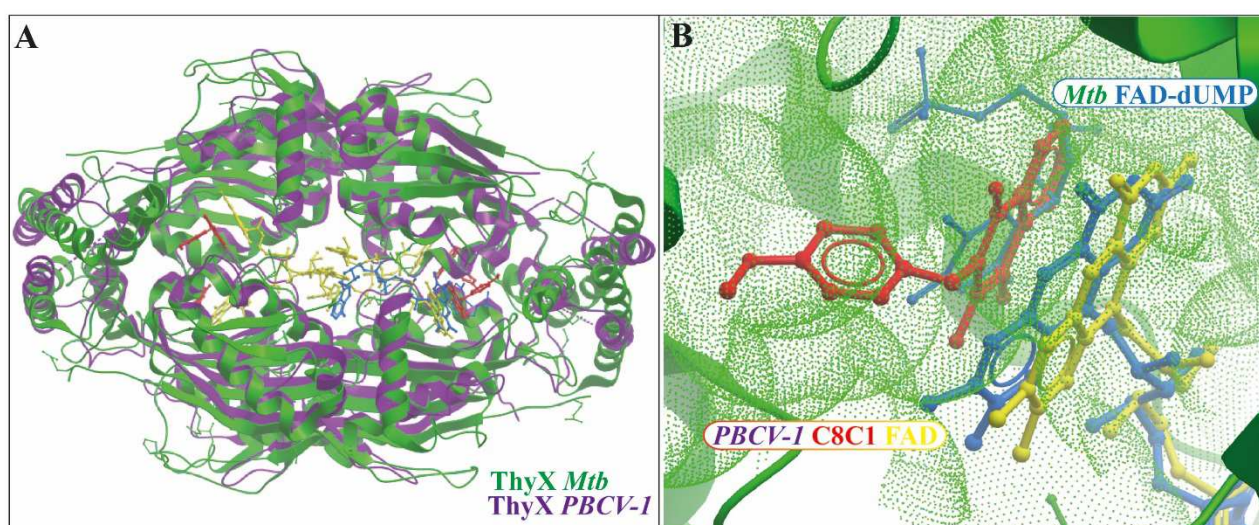


Figure 4-25 C8C1 provoque un encombrement stérique très important au site de fixation du dUMP dans ThyX *Mtb*. A. Alignement de la structure de *PBCV-1* ThyX-FAD-C8C1 (PDB : 4FZB) et de *Mtb* ThyX-FAD-BrdUMP (PDB : 2AF6). ThyX *PBCV-1* est en violet, son FAD en jaune et C8C1 en rouge. ThyX *Mtb* et sa surface sont en vert, son FAD et BrdUMP en bleu. B. zoom sur le site actif de ThyX. La chaîne méthoxy-benzyle de C8C1 occupe le même espace qu'une partie de la chaîne D de ThyX *Mtb*. Images réalisées avec MolSoft.

Nous pouvons voir dans la figure 4-25 la superposition des structures de *PBCV-1* ThyX-FAD-C8C1 et de *Mtb* ThyX-FAD-BrdUMP. Cette superposition montre que les interactions qu'établit C8C1 dans le site actif de ThyX *PBCV-1* ne sont pas transposables à ThyX *Mtb*. La chaîne méthoxy-phényle attachée au carbone 3 du cœur naphthoquinone dans C8C1 interagit avec une cavité dans ThyX *PBCV-1* [94] qui ne se retrouve pas dans ThyX *Mtb*. Cette explication semble satisfaisante : elle éclaire d'une part la cause de la différence dans le type d'inhibition entre les deux enzymes, et reste cohérente avec l'existence d'un autre mode de fixation des naphthoquinones sur ThyX *Mtb* qui permet l'inhibition observée de son activité par ces naphthoquinones.

4.3.2 Criblage et modèle pharmacophore de ThyX *Mtb*

Afin d'optimiser le pouvoir inhibiteur des naphthoquinones, nous avons réalisé un crible en sélectionnant des molécules en fonction de leur similarité de structure au noyau naphthoquinone, de leur inhibition de l'ADN Gyrase de *Mtb*, ou de leur effet antimycobactérien mentionné dans la littérature. Les molécules sélectionnées ont été testées pour leur inhibition de ThyX *Mtb*, contrôlées pour leur spécificité par rapport à la ThyA Humaine, ainsi que pour leur pouvoir antimycobactérien contre *Mycobacterium smegmatis*. Les résultats du crible ont permis d'une part d'identifier une nouvelle série d'inhibiteurs dont nous avons caractérisé le mode d'inhibition *in vitro*, et d'autre part, de construire successivement des modèles pharmacophores d'inhibition de ThyX *Mtb*, alors

que nous testions différentes molécules au fur et à mesure. Un des modèle a été utilisé pour cribler *in silico* la collection clinique de la NIH qui récence 700 molécules en essai clinique pour différents troubles. Cette seconde approche a permis d'identifier l'idebenone, une quinone en phase 3 d'essai clinique pour la myopathie de Duchenne, dont les propriétés pharmacocinétiques sont acceptables [130].

La dernière partie de notre travail a consisté à estimer la sélectivité des molécules identifiées pour la cible ThyX *in vivo*, dans *Mtb*. Pour cela, une souche *thyX* Tet-OFF a permis de mesurer si une sensibilisation de la souche aux différentes molécules identifiées pouvait être observée lorsque ThyX est depletée *in vivo*, comme il a précédemment été montré pour le 5-fluorouracile [129]. Cette approche nous a permis d'identifier deux molécules sélective pour la cible *in vivo* : E1 et l'idebenone, issues du crible présenté en partie 4.2.5 et du criblage *in silico* réalisé avec notre modèle pharmacophore d'inhibition de ThyX *Mtb*, respectivement.

Enfin, nous avons construit un modele bayésien d'inhibition de ThyX *Mtb* qui résume l'ensemble de nos criblages. Nous avons validé la robustesse de ce modèle en le testant pour prédire l'activité de 14 molécule que nous avons subséquentment testé à la fois sur ThyX *Mtb in vitro*, et contre des souches cliniques (de sensibles à multi-résistantes) de *Mtb*.

En résumé, nous avons fonctionnalisé le noyau naphthoquinone afin d'identifier d'une part des inhibiteurs spécifiques de ThyX *Mtb*, dont l'efficacité a été améliorée de 100 fois (220 à 2 μ M environ), et d'autre part de développer un modèle *in silico* d'inhibition de ThyX *Mtb*. Enfin, nous avons pu montrer que certaines molécules sélectionnées par ces méthodes inhibent ThyX dans *Mtb*, d'où leur effet antimycobactérien, validant par la même occasion notre stratégie de cibler ThyX dans *Mtb*, comme nous l'avons fait pour *Helicobacter pylori* (Annexe 1, [76]).

Les constantes d'inhibition et les MIC présentées ne sont pas encore satisfaisantes pour pouvoir envisager une application thérapeutique avec ces molécules. Nous avons vérifié que ces molécules étaient spécifiques de ThyX *Mtb* par rapport à la ThyA Humaine, mais il est probable que ces molécules aient un effet toxique sur des cellules humaines. Nous avons néanmoins pu cumuler des informations sur leur mode d'inhibition qui peuvent nous permettre de les optimiser d'avantage. Plus précisément, le modèle bayésien d'inhibition de ThyX offre des perspectives intéressantes en termes de vitesse de sélection de nouvelles molécules à tester que nous pourrions prioriser sur la base de ses prédictions. Ce modèle présente également des avantages en termes de rentabilité car il nous affranchit de la nécessité de tester de larges banques de molécules *in vitro*, ce type de projet pouvant se montrer couteux en raison du prix et du nombre de molécules à tester.

4.3.3 Relation structure-activité

Un second aspect de notre étude offre également des perspectives intéressantes. Nous avons caractérisé le mode d'inhibition de 8 molécules (7 molécules + C8C1) et avons recueillis des informations sur le mode de fixation de ces dernières.

Par exemple, C8C1 et D5 présentent des effets intéressants sur ThyX *Mtb*. C8C1 est un inhibiteur nanomolaire, compétitif de la fixation du dUMP dans ThyX *PBCV-1*. Nous avons montré qu'il n'est pas un inhibiteur compétitif du site de fixation du dUMP dans ThyX *Mtb*, et que sa constante d'inhibition est de 220 μM . D5 présente une constante d'inhibition de 2.15 μM , 100 fois meilleure, et ne cible pas non plus le site de fixation du dUMP. Or ces molécules ne varient que d'un groupement en position 2 du noyau naphthoquinones (Fig. 4-26).

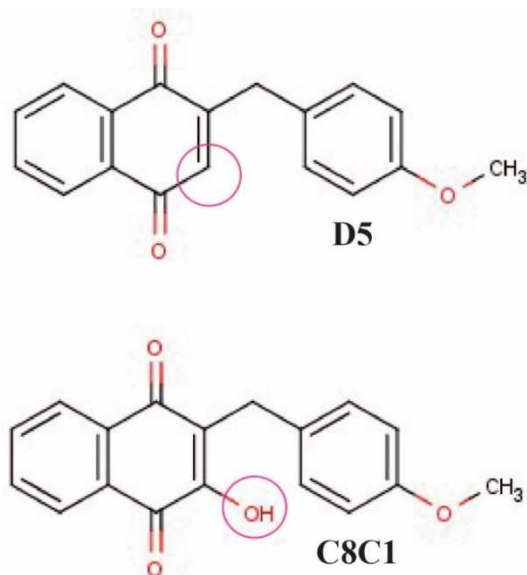


Figure 4-26 : Structure de D5 et de C8C1. L'unique différence structurale entre les deux molécules est le groupement hydroxy en position 2 du cœur naphthoquinone, entouré en rose.

Il apparait ainsi que ce groupement -OH gêne l'action de la molécule sur le site actif de ThyX *Mtb* et sa suppression améliore l'efficacité de la molécule de 100 fois. Nous pouvons en déduire que le groupement hydroxy sur le carbone 2 des naphthquinones gêne leur fixation, et donc leur effet, sur ThyX *Mtb*. Ces observations sont en accord avec l'ajustement de C8C1 au modèle pharmacophore (N18) que nous avons développé pour l'inhibition de ThyX *Mtb* (Fig. 4-24) où nous pouvons voir le groupement 2-Hydroxy co-localisé avec un volume exclu. Cette modification devra être évitée dans les sélections à venir.

Un second point notable est le mode d'inhibition d'E1, F1 et F2 (Fig. 4-27). Ces trois molécules ont des structures similaires, or E1 est non-compétitif du dUMP et incompétitif du CH₂H₄folate, tandis que F1 et F2 sont compétitifs des deux substrats.

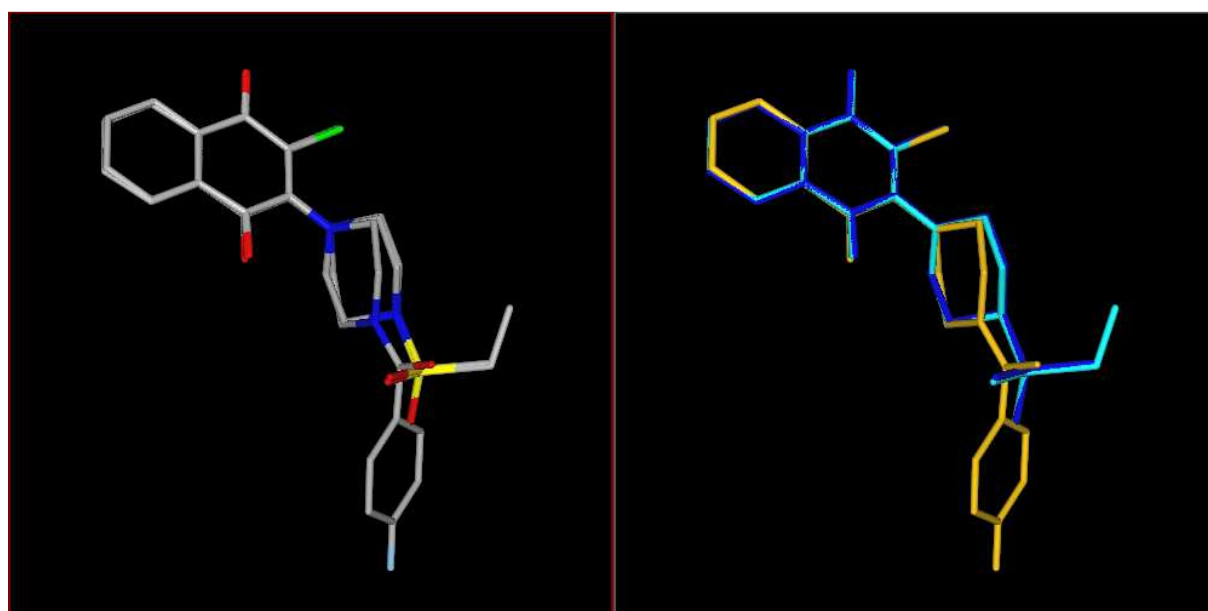


Figure 4-27 : Alignement tridimensionnel de E1, F1 et F2. Réalisé avec Marvin sketch.

Ces 3 molécules ne varient que par l'extrémité de la chaîne placée en position 3 du cœur naphthoquinone. E1 présente la chaîne la plus courte tandis que F1 et F2 sont composées d'un fluoro-phényle et d'un méthyle additionnels respectivement. L'addition de ces groupements gêne la fixation à la fois du dUMP et du CH₂H₄folate. L'hypothèse la plus simple serait que l'extrémité des chaînes de F1 et F2 interfèrent avec la fixation des deux substrats à la fois, et occupe donc un site à l'interface entre eux.

Les molécules sélectionnées à l'avenir devront donc contenir une série de variants d'E1, additionnés de différents types de groupements (hydrophobe, polaires, ...), de tailles différentes afin d'améliorer l'efficacité de ces molécules. Des dérivés de l'idébenone devront également être testés pour l'inhibition de ThyX *Mtb* dans une stratégie de réorientation [131].

De manière générale, nous avons montré que la plupart des naphthoquinones testées qui inhibent l'activité de ThyX *Mtb* ne ciblent pas le site de fixation du dUMP. Cela suggère qu'un autre site de fixation existe pour ces molécules dans la structure de ThyX *Mtb*, et ce site devra être déterminé par des études structurales (cristallographie, Résonance Magnétique Nucléaire) ou biochimiques (mutation dirigés afin de définir quels acides aminés sont impliqués dans l'inhibition par ces molécules).

Les molécules que nous pourrions proposer sur la base de ces observations seront évaluées par notre modèle bayésien d'inhibition de ThyX *Mtb* afin de prioriser les candidats à tester. Enfin, nous continuerons à actualiser ce modèle sur la base de nos résultats afin de le perfectionner.

4.3.4 Perspectives et effet antimycobactérien

Nous avons mis en exergue la sélectivité de deux molécules (E1 et Idebenone) pour la cible *in vivo*, dans *Mtb* et notre modèle a effectivement sélectionné l'idebenone, inhibiteur de ThyX actif dans *Mtb*. Cependant, certaines molécules sont aujourd'hui considérés comme « bons » inhibiteurs de ThyX *Mtb* dans nos modèles actuels, tandis que nous montrons d'autre part qu'elles ne sont pas suffisamment sélectifs pour ThyX *in vivo*. Afin de perfectionner ce modèle, nous pouvons imaginer réaliser nos futurs cribles par une approche basé sur la cible, ThyX, *in vivo*.

Pourquoi ? Nous avons discuté dans l'introduction (1.10) des limites de l'approche target-to-drug, à savoir la transposition d'un effet *in vitro* (IC₅₀) à un effet *in vivo* (MIC). Or un effet *in vivo* traduit le pouvoir inhibiteur d'une molécule sur sa cible essentielle dans la cellule. L'estimation de la sélectivité des molécules pour notre cible s'adresse spécifiquement à cette limite car elle valide notre modèle *in silico* pour la sélection d'inhibiteurs *in vivo*.

Comment ? Un inhibiteur de ThyX *Mtb* sélectif *in vivo* pour sa cible verra sa MIC₉₀ se décaler lorsque la concentration de ThyX est modulée dans la

bactérie car ThyX est essentielle. Moyennant une mise au point et des contrôles, nous pouvons imaginer réaliser les cribles futurs de cette manière afin de n'inclure que des inhibiteurs actifs *in vivo*. La souche de *Mtb thyX-TetOFF* pourra être mise en culture avec une concentration de molécule (50 μ M par exemple), en absence et en présence de 6,25 ng/ml d'ATc. Nous proposons 6.25ng/ml d'ATc car c'est à cette concentration d'inducteur que la concentration de ThyX *in vivo* devient limitante pour la croissance [129]. C'est donc à cette concentration d'ATc qu'une inhibition de ThyX *in vivo* aura un effet significativement plus grand sur la croissance (la donnée expérimentale à laquelle nous avons accès). Les croissances dans ces conditions pourront donc être mesurées et leur comparaison permettrait d'estimer si la molécule inhibe effectivement ThyX dans *Mtb*. Il s'agirait dans ce cas d'un crible basé sur la cible, réalisé directement sur les bactéries en culture (target-based whole cell screening).

Si nous désirons accélérer ce processus, nous pourrions réaliser le même type de construction dans *M. smegmatis* (mycobactérie non pathogène à croissance rapide) en utilisant la ThyX de *Mtb* (*M. smegmatis* Δ *thyXMsmegmatis::TetOFF-thyXMtb*). Cette méthode doit théoriquement nous orienter vers des molécules plus efficaces contre ThyX *Mtb*, en considérant à la fois la pénétration des molécules dans les bactéries, et leur sélectivité pour ThyX *Mtb* dans des conditions physiologiques.

5. Chapitre V – Conclusion

La tuberculose est la deuxième maladie infectieuse la plus meurtrière au monde et constitue un problème de santé mondiale. Elle est causée principalement par une bactérie pathogène, *Mycobacterium tuberculosis*, qui infecte sous forme latente un tiers de la population mondiale [1]. *Mtb* se caractérise par une sa capacité d'adaptation aux conditions sévères auxquelles elle est exposé durant son cycle infectieux, ainsi que par sa capacité de persistance sous forme dormante, état physiologique ralenti qui lui confère une tolérance aux antituberculeux. Les traitements doivent par conséquent être administrés sur un temps plus long afin de neutraliser les diverses populations de bactérie dans un patient, induisant des défauts d'observance et des pertes de suivi. Ces caractéristiques propres à la bactérie combinées à l'utilisation abusives des antibiotiques et à la mauvaise observance des patients participent grandement à l'émergence de souches résistantes aux traitements de première et seconde ligne. Nous avons aujourd'hui besoin de molécules différentes avec de nouveaux modes d'action afin de combattre cette épidémie.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à ThyX *Mtb*, une thymidylate synthase flavine-dépendante essentielle et suffisante dans *Mtb*. Nous avons étudié la cinétique de son mécanisme et montré comment la dynamique du site actif contrôle efficacement l'initiation de la réaction. Nous avons également caractérisé son inhibition par les naphtoquinones, inhibiteurs de ThyX

recemment découvert, et mis en évidence des différences clés dans leur type d'inhibition spécifiquement sur ThyX *Mtb*. Enfin, nous avons criblé cette classe de molécules *in vitro* pour l'inhibition de ThyX *Mtb* et construit un modele pharmacophore qui permet de réaliser des cribles *in silico*. Cette approche pluridisciplinaire nous a permis d'identifier une nouvelle série d'inhibiteurs de ThyX *Mtb* dont deux molécules sélectives pour la cible *in vivo*. Les données accumulées et les outils développés pendant cette thèse permettront d'accélérer la sélection de nouveaux candidats et améliorer le pouvoir à la fois inhibiteur de ThyX *Mtb* et antimycobactérien de ces molécules.

Nous avons validé notre approche de cibler ThyX pour le développement d'antibiotiques dirigés contre *Helicobacter pylori* et *Mycobacterium tuberculosis*, qui infecte un demi et un tiers de la population mondiale respectivement [76]. Des résultats préliminaires ont par ailleurs montré que la nouvelle série de naphthoquinones identifiée présente un grand pouvoir inhibiteur contre un grand nombre de ThyX issues de différents pathogènes (*Chlamydia trachomatis*, *Borrelia hermsii*, *Rickettsia prowazekii*). Nous espérons pouvoir montrer que ThyX peut être ciblée par des molécules au pouvoir antibiotique à spectre large, et à plus long terme, intégrer cette finalité à notre stratégie de développement d'antibiotiques en réalisant des criblages transversaux contre plusieurs ThyX par une approche combinée similaire à celle présentée ici.

6. Bibliographie

1. World Health Organization., *Global tuberculosis report 2014*. 2014, Geneva: World Health Organization. 154 p.
2. Lienhardt, C., et al., *Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(6): p. 407-16.
3. Gutierrez, M.C., et al., *Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Pathog, 2005. **1**(1): p. e5.
4. Comas, I., et al., *Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans*. Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1176-82.
5. Merker, M., et al., *Evolutionary history and global spread of the Mycobacterium tuberculosis Beijing lineage*. Nat Genet, 2015. **47**(3): p. 242-9.
6. Brites, D. and S. Gagneux, *Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens*. Immunol Rev, 2015. **264**(1): p. 6-24.
7. Wirth, T., et al., *Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex*. PLoS Pathog, 2008. **4**(9): p. e1000160.
8. Djelouadji, Z., et al., *A single-step sequencing method for the identification of Mycobacterium tuberculosis complex species*. PLoS Negl Trop Dis, 2008. **2**(6): p. e253.
9. Kieser, K.J. and E.J. Rubin, *How sisters grow apart: mycobacterial growth and division*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(8): p. 550-62.
10. Dartois, V., *The path of anti-tuberculosis drugs: from blood to lesions to mycobacterial cells*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(3): p. 159-67.
11. Cole, S.T., et al., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 537-44.
12. Koul, A., et al., *The challenge of new drug discovery for tuberculosis*. Nature, 2011. **469**(7331): p. 483-90.
13. Gengenbacher, M. and S.H. Kaufmann, *Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy*. FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(3): p. 514-32.
14. Sturgill-Koszycki, S., et al., *Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase*. Science, 1994. **263**(5147): p. 678-81.
15. Russell, D.G., *Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(8): p. 569-77.

16. Deretic, V., et al., *Autophagy in immunity against mycobacterium tuberculosis: a model system to dissect immunological roles of autophagy*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009. **335**: p. 169-88.
17. Ng, V.H., et al., *Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst*. *Mol Microbiol*, 2004. **52**(5): p. 1291-302.
18. Ehrt, S. and D. Schnappinger, *Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses*. *Cell Microbiol*, 2009. **11**(8): p. 1170-8.
19. Getahun, H., et al., *Latent Mycobacterium tuberculosis infection*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(22): p. 2127-35.
20. Theron, G., et al., *The diagnostic accuracy of the GenoType((R)) MTBDRsl assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014. **10**: p. CD010705.
21. Bonnet, M., *[New diagnostic tests for tuberculosis in southern countries: from theory to practice in southern countries]*. *Rev Mal Respir*, 2011. **28**(10): p. 1310-21.
22. Habeenzu, C., D. Lubasi, and A.F. Fleming, *'Improved sensitivity of direct microscopy for detection of acid-fast bacilli in sputum in developing countries*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1998. **92**(4): p. 415-6.
23. Zaib un, N., et al., *Comparison of fluorescence microscopy and Ziehl-Neelsen technique in diagnosis of tuberculosis in paediatric patients*. *J Pak Med Assoc*, 2015. **65**(8): p. 879-81.
24. Munot, P.P., et al., *Detection of Acid Fast Bacilli in Saliva using Papanicolaou Stain Induced Fluorescence Method Versus Fluorochrome Staining: An Evaluative Study*. *J Int Oral Health*, 2015. **7**(7): p. 115-20.
25. Moore, D.A., et al., *Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(15): p. 1539-50.
26. Steingart, K.R., et al., *Xpert(R) MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014. **1**: p. CD009593.
27. Drobniewski, F.A. and S.M. Wilson, *The rapid diagnosis of isoniazid and rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis--a molecular story*. *J Med Microbiol*, 1998. **47**(3): p. 189-96.
28. Hanrahan, C.F. and M. Shah, *Economic challenges associated with tuberculosis diagnostic development*. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res*, 2014. **14**(4): p. 499-510.
29. Munoz, L. and M. Santin, *Interferon-gamma release assays versus tuberculin skin test for targeting people for tuberculosis preventive*

- treatment: an evidence-based review*. J Infect, 2013. **66**(4): p. 381-7.
30. Horvat, R.T., *Gamma Interferon Assays Used in the Diagnosis of Tuberculosis*. Clin Vaccine Immunol, 2015. **22**(8): p. 845-9.
 31. Salgame, P., et al., *Latent tuberculosis infection--Revisiting and revising concepts*. Tuberculosis (Edinb), 2015. **95**(4): p. 373-84.
 32. Davies, G.R., *Early clinical development of anti-tuberculosis drugs: science, statistics and sterilizing activity*. Tuberculosis (Edinb), 2010. **90**(3): p. 171-6.
 33. Schubert, O.T., et al., *Absolute Proteome Composition and Dynamics during Dormancy and Resuscitation of Mycobacterium tuberculosis*. Cell Host Microbe, 2015. **18**(1): p. 96-108.
 34. Millard, J., C. Ugarte-Gil, and D.A. Moore, *Multidrug resistant tuberculosis*. BMJ, 2015. **350**: p. h882.
 35. Zhang, Y. and W.W. Yew, *Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2009. **13**(11): p. 1320-30.
 36. Banerjee, A., et al., *inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis*. Science, 1994. **263**(5144): p. 227-30.
 37. Argyrou, A., et al., *Proteome-wide profiling of isoniazid targets in Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry, 2006. **45**(47): p. 13947-53.
 38. Miotto, P., D.M. Cirillo, and G.B. Migliori, *Drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: molecular mechanisms challenging fluoroquinolones and pyrazinamide effectiveness*. Chest, 2015. **147**(4): p. 1135-43.
 39. Shi, W., et al., *Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis*. Science, 2011. **333**(6049): p. 1630-2.
 40. Zhang, S., et al., *Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Emerg Microbes Infect, 2013. **2**(6): p. e34.
 41. Belanger, A.E., et al., *The embAB genes of Mycobacterium avium encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11919-24.
 42. Minato, Y., et al., *Mycobacterium tuberculosis Folate Metabolism and the Mechanistic Basis for para-Aminosalicylic Acid Susceptibility and Resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(9): p. 5097-106.

43. Zheng, J., et al., *para-Aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem, 2013. **288**(32): p. 23447-56.
44. Fivian-Hughes, A.S., J. Houghton, and E.O. Davis, *Mycobacterium tuberculosis thymidylate synthase gene thyX is essential and potentially bifunctional, while thyA deletion confers resistance to p-aminosalicylic acid*. Microbiology, 2012. **158**(Pt 2): p. 308-18.
45. Jnawali, H.N., et al., *Molecular genetics of Mycobacterium tuberculosis resistant to aminoglycosides and cyclic peptide capreomycin antibiotics in Korea*. World J Microbiol Biotechnol, 2013. **29**(6): p. 975-82.
46. Kim, D.H., et al., *Treatment outcomes and long-term survival in patients with extensively drug-resistant tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(10): p. 1075-82.
47. Andries, K., et al., *A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of Mycobacterium tuberculosis*. Science, 2005. **307**(5707): p. 223-7.
48. Leibert, E., M. Danckers, and W.N. Rom, *New drugs to treat multidrug-resistant tuberculosis: the case for bedaquiline*. Ther Clin Risk Manag, 2014. **10**: p. 597-602.
49. Szumowski, J.D. and J.B. Lynch, *Profile of delamanid for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis*. Drug Des Devel Ther, 2015. **9**: p. 677-82.
50. Field, S.K., *Bedaquiline for the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: great promise or disappointment?* Ther Adv Chronic Dis, 2015. **6**(4): p. 170-84.
51. Gurumurthy, M., et al., *A novel F(420) -dependent anti-oxidant mechanism protects Mycobacterium tuberculosis against oxidative stress and bactericidal agents*. Mol Microbiol, 2013. **87**(4): p. 744-55.
52. Sotgiu, G., et al., *Delamanid (OPC-67683) for treatment of multi-drug-resistant tuberculosis*. Expert Rev Anti Infect Ther, 2015. **13**(3): p. 305-15.
53. Mdluli, K., T. Kaneko, and A. Upton, *The tuberculosis drug discovery and development pipeline and emerging drug targets*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(6).
54. Schmalstieg, A.M., et al., *The antibiotic resistance arrow of time: efflux pump induction is a general first step in the evolution of mycobacterial drug resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(9): p. 4806-15.
55. Flores, A.R., L.M. Parsons, and M.S. Pavelka, Jr., *Genetic analysis of the beta-lactamases of Mycobacterium tuberculosis and*

- Mycobacterium smegmatis* and susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Microbiology*, 2005. **151**(Pt 2): p. 521-32.
56. Borrell, S. and S. Gagneux, *Infectiousness, reproductive fitness and evolution of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009. **13**(12): p. 1456-66.
 57. Bottger, E.C. and B. Springer, *Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control*. *Eur J Pediatr*, 2008. **167**(2): p. 141-8.
 58. Song, T., et al., *Fitness costs of rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis are amplified under conditions of nutrient starvation and compensated by mutation in the beta' subunit of RNA polymerase*. *Mol Microbiol*, 2014. **91**(6): p. 1106-19.
 59. Nebenzahl-Guimaraes, H., et al., *Systematic review of allelic exchange experiments aimed at identifying mutations that confer drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, 2014. **69**(2): p. 331-42.
 60. Sala, C. and R.C. Hartkoorn, *Tuberculosis drugs: new candidates and how to find more*. *Future Microbiol*, 2011. **6**(6): p. 617-33.
 61. Pethe, K., et al., *A chemical genetic screen in Mycobacterium tuberculosis identifies carbon-source-dependent growth inhibitors devoid of in vivo efficacy*. *Nat Commun*, 2010. **1**: p. 57.
 62. Hopkins, A.L. and C.R. Groom, *The druggable genome*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(9): p. 727-30.
 63. Russ, A.P. and S. Lampel, *The druggable genome: an update*. *Drug Discov Today*, 2005. **10**(23-24): p. 1607-10.
 64. Roemer, T. and C. Boone, *Systems-level antimicrobial drug and drug synergy discovery*. *Nat Chem Biol*, 2013. **9**(4): p. 222-31.
 65. Cheng, A.C., et al., *Structure-based maximal affinity model predicts small-molecule druggability*. *Nat Biotechnol*, 2007. **25**(1): p. 71-5.
 66. Villoutreix, B.O., et al., *A leap into the chemical space of protein-protein interaction inhibitors*. *Curr Pharm Des*, 2012. **18**(30): p. 4648-67.
 67. Lechartier, B., et al., *Tuberculosis drug discovery in the post-post-genomic era*. *EMBO Mol Med*, 2014. **6**(2): p. 158-68.
 68. Kling, A., et al., *Antibiotics. Targeting DnaN for tuberculosis therapy using novel griselimycins*. *Science*, 2015. **348**(6239): p. 1106-12.
 69. Christophe, T., et al., *High content screening identifies decaprenyl-phosphoribose 2' epimerase as a target for intracellular antimycobacterial inhibitors*. *PLoS Pathog*, 2009. **5**(10): p. e1000645.

70. Willand, N., et al., *Synthetic EthR inhibitors boost antituberculous activity of ethionamide*. Nat Med, 2009. **15**(5): p. 537-44.
71. Myllykallio, H., et al., *An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis*. Science, 2002. **297**(5578): p. 105-7.
72. Warner, D.F., J.C. Evans, and V. Mizrahi, *Nucleotide Metabolism and DNA Replication*. Microbiol Spectr, 2014. **2**(5).
73. Mathys, V., et al., *Molecular genetics of para-aminosalicylic acid resistance in clinical isolates and spontaneous mutants of Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(5): p. 2100-9.
74. Zhang, H., et al., *Genome sequencing of 161 Mycobacterium tuberculosis isolates from China identifies genes and intergenic regions associated with drug resistance*. Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1255-60.
75. Merker, M., et al., *Whole genome sequencing reveals complex evolution patterns of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis Beijing strains in patients*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82551.
76. Skouloubris, S., et al., *Targeting of Helicobacter pylori thymidylate synthase ThyX by non-mitotoxic hydroxy-naphthoquinones*. Open Biol, 2015. **5**(6): p. 150015.
77. Bollenbach, T., *Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution*. Curr Opin Microbiol, 2015. **27**: p. 1-9.
78. Raju, A., et al., *Antifolate Activity of Plant Polyphenols against Mycobacterium tuberculosis*. Phytother Res, 2015. **29**(10): p. 1646-51.
79. Jia, J., et al., *Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(2): p. 111-28.
80. Guzman, E.C. and C.M. Martin, *Thymineless death, at the origin*. Front Microbiol, 2015. **6**: p. 499.
81. Khodursky, A., E.C. Guzman, and P.C. Hanawalt, *Thymineless Death Lives On: New Insights into a Classic Phenomenon*. Annu Rev Microbiol, 2015.
82. Abeysinghe, T. and A. Kohen, *Role of long-range protein dynamics in different thymidylate synthase catalyzed reactions*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(4): p. 7304-19.
83. Carreras, C.W. and D.V. Santi, *The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 721-62.
84. Leduc, D., et al., *Functional evidence for active site location of tetrameric thymidylate synthase X at the interphase of three monomers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(19): p. 7252-7.

85. Ulmer, J.E., et al., *Functional analysis of the Mycobacterium tuberculosis FAD-dependent thymidylate synthase, ThyX, reveals new amino acid residues contributing to an extended ThyX motif.* J Bacteriol, 2008. **190**(6): p. 2056-64.
86. Mishanina, T.V., J.M. Corcoran, and A. Kohen, *Substrate activation in flavin-dependent thymidylate synthase.* J Am Chem Soc, 2014. **136**(30): p. 10597-600.
87. Mishanina, T.V., et al., *Trapping of an intermediate in the reaction catalyzed by flavin-dependent thymidylate synthase.* J Am Chem Soc, 2012. **134**(9): p. 4442-8.
88. Conrad, J.A., et al., *Detection of intermediates in the oxidative half-reaction of the FAD-dependent thymidylate synthase from Thermotoga maritima: carbon transfer without covalent pyrimidine activation.* Biochemistry, 2014. **53**(32): p. 5199-207.
89. Sampathkumar, P., et al., *Structure of the Mycobacterium tuberculosis flavin dependent thymidylate synthase (MtbThyX) at 2.0Å resolution.* J Mol Biol, 2005. **352**(5): p. 1091-104.
90. Becker, H.F., et al., *Substrate interaction dynamics and oxygen control in the active site of thymidylate synthase ThyX.* Biochem J, 2014. **459**(1): p. 37-45.
91. Laptенок, S.P., et al., *Ultrafast real-time visualization of active site flexibility of flavoenzyme thymidylate synthase ThyX.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(22): p. 8924-9.
92. Koehn, E.M., et al., *Folate binding site of flavin-dependent thymidylate synthase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(39): p. 15722-7.
93. Graziani, S., et al., *Catalytic mechanism and structure of viral flavin-dependent thymidylate synthase ThyX.* J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 24048-57.
94. Basta, T., et al., *Mechanistic and structural basis for inhibition of thymidylate synthase ThyX.* Open Biol, 2012. **2**(10): p. 120120.
95. Ollinger, K. and A. Brunmark, *Effect of hydroxy substituent position on 1,4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes.* J Biol Chem, 1991. **266**(32): p. 21496-503.
96. Kumagai, Y., et al., *The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2012. **52**: p. 221-47.
97. Wang, S.H., et al., *Synthesis and Biological Evaluation of Lipophilic 1,4-Naphthoquinone Derivatives against Human Cancer Cell Lines.* Molecules, 2015. **20**(7): p. 11994-2015.
98. Inagaki, R., et al., *Synthesis, Characterization, and Antileukemic Properties of Naphthoquinone Derivatives of Lawsone.* ChemMedChem, 2015. **10**(8): p. 1413-23.

99. Schuck, D.C., et al., *Biological evaluation of hydroxynaphthoquinones as anti-malarials*. *Malar J*, 2013. **12**: p. 234.
100. Cho, S.C., M.Z. Sultan, and S.S. Moon, *Anti-acne activities of pulsaquinone, hydropulsaquinone, and structurally related 1, 4-quinone derivatives*. *Arch Pharm Res*, 2009. **32**(4): p. 489-94.
101. Hunter, J.H., et al., *Kinetics and ligand-binding preferences of Mycobacterium tuberculosis thymidylate synthases, ThyA and ThyX*. *PLoS One*, 2008. **3**(5): p. e2237.
102. Graziani, S., et al., *Functional analysis of FAD-dependent thymidylate synthase ThyX from Paramecium bursaria Chlorella virus-1*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(52): p. 54340-7.
103. Kogler, M., et al., *Synthesis and evaluation of 5-substituted 2'-deoxyuridine monophosphate analogues as inhibitors of flavin-dependent thymidylate synthase in Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Chem*, 2011. **54**(13): p. 4847-62.
104. Mehellou, Y., J. Balzarini, and C. McGuigan, *Aryloxy phosphoramidate triesters: a technology for delivering monophosphorylated nucleosides and sugars into cells*. *ChemMedChem*, 2009. **4**(11): p. 1779-91.
105. McGuigan, C., et al., *ProTides of N-(3-(5-(2'-deoxyuridine))prop-2-ynyl)octanamide as potential anti-tubercular and anti-viral agents*. *Bioorg Med Chem*, 2014. **22**(9): p. 2816-24.
106. Esra Onen, F., et al., *Design, synthesis and evaluation of potent thymidylate synthase X inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008. **18**(12): p. 3628-31.
107. Mattevi, A., *To be or not to be an oxidase: challenging the oxygen reactivity of flavoenzymes*. *Trends Biochem Sci*, 2006. **31**(5): p. 276-83.
108. Imlay, J.A., *The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium*. *Nat Rev Microbiol*, 2013. **11**(7): p. 443-54.
109. Yamada, T., H. Onimatsu, and J.L. Van Etten, *Chlorella viruses*. *Adv Virus Res*, 2006. **66**: p. 293-336.
110. Wang, Z., et al., *Oxidase activity of a flavin-dependent thymidylate synthase*. *FEBS J*, 2009. **276**(10): p. 2801-10.
111. Fenchel, T. and B. Finlay, *Oxygen and the spatial structure of microbial communities*. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 2008. **83**(4): p. 553-69.
112. Wolfenden, R., *Transition state analog inhibitors and enzyme catalysis*. *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1976. **5**: p. 271-306.

113. Leduc, D., et al., *Flavin-dependent thymidylate synthase ThyX activity: implications for the folate cycle in bacteria*. J Bacteriol, 2007. **189**(23): p. 8537-45.
114. Kumar, A., et al., *Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control?* Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: p. e39.
115. Copeland, R.A., *Conformational adaptation in drug-target interactions and residence time*. Future Med Chem, 2011. **3**(12): p. 1491-501.
116. Mason, A., et al., *A lag-phase in the reduction of flavin dependent thymidylate synthase (FDTS) revealed a mechanistic missing link*. Chem Commun (Camb), 2006(16): p. 1781-3.
117. Chernyshev, A., et al., *The relationships between oxidase and synthase activities of flavin dependent thymidylate synthase (FDTS)*. Chem Commun (Camb), 2007(27): p. 2861-3.
118. Agrawal, N., et al., *Mechanistic studies of a flavin-dependent thymidylate synthase*. Biochemistry, 2004. **43**(32): p. 10295-301.
119. Koehn, E.M., et al., *An unusual mechanism of thymidylate biosynthesis in organisms containing the thyX gene*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 919-23.
120. Meylan, P.R., D.D. Richman, and R.S. Kornbluth, *Reduced intracellular growth of mycobacteria in human macrophages cultivated at physiologic oxygen pressure*. Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(4 Pt 1): p. 947-53.
121. Imlay, J.A., *Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide*. Annu Rev Biochem, 2008. **77**: p. 755-76.
122. Signore, A., et al., *Can we produce an image of bacteria with radiopharmaceuticals?* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2008. **35**(6): p. 1051-5.
123. Czekster, C.M., A. Vandemeulebroucke, and J.S. Blanchard, *Two parallel pathways in the kinetic sequence of the dihydrofolate reductase from Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry, 2011. **50**(32): p. 7045-56.
124. Trivedi, A., et al., *Redox biology of tuberculosis pathogenesis*. Adv Microb Physiol, 2012. **60**: p. 263-324.
125. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
126. Ekins, S. and B.A. Bunin, *The Collaborative Drug Discovery (CDD) database*. Methods Mol Biol, 2013. **993**: p. 139-54.
127. Dziadek, J., et al., *Conditional expression of Mycobacterium smegmatis ftsZ, an essential cell division gene*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 6): p. 1593-603.

128. Altaf, M., et al., *Evaluation of the Mycobacterium smegmatis and BCG models for the discovery of Mycobacterium tuberculosis inhibitors*. Tuberculosis (Edinb), 2010. **90**(6): p. 333-7.
129. Singh, V., et al., *The complex mechanism of antimycobacterial action of 5-fluorouracil*. Chem Biol, 2015. **22**(1): p. 63-75.
130. Buyse, G.M., et al., *Idebenone as a novel, therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy: results from a 12 month, double-blind, randomized placebo-controlled trial*. Neuromuscul Disord, 2011. **21**(6): p. 396-405.
131. Rybniker, J., et al., *Lansoprazole is an antituberculous prodrug targeting cytochrome bc1*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7659.

**7. Annexe 1 : Ciblage de la thymidylate synthase ThyX
de *Helicobacter pylori* par des hydroxy-
naphthoquinones non-mitotoxiques.**



Cite this article: Skouloubris S, Djaout K, Lamarre I, Lambry J-C, Anger K, Briffotiaux J, Liebl U, de Reuse H, Myllykallio H. 2015 Targeting of *Helicobacter pylori* thymidylate synthase ThyX by non-mitotoxic hydroxy-naphthoquinones. *Open Biol.* **5**: 150015.
<http://dx.doi.org/10.1098/rsob.150015>

Received: 26 January 2015

Accepted: 10 May 2015

Subject Area:

microbiology/biochemistry

Keywords:naphthoquinone, anti-microbial agents, *Helicobacter pylori*, thymidylate synthase ThyX**Authors for correspondence:**

Stéphane Skouloubris

e-mail: stephane.skouloubris@u-psud.fr

Hannu Myllykallio

e-mail: hannu.myllykallio@polytechnique.eduElectronic supplementary material is available at <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.150015>.Targeting of *Helicobacter pylori* thymidylate synthase ThyX by non-mitotoxic hydroxy-naphthoquinonesStéphane Skouloubris^{1,2}, Kamel Djaout¹, Isabelle Lamarre¹, Jean-Christophe Lambry¹, Karine Anger³, Julien Briffotiaux¹, Ursula Liebl¹, Hilde de Reuse³ and Hannu Myllykallio¹¹Laboratoire d'Optique et Biosciences, CNRS UMR7645, INSERM U1182, Ecole Polytechnique, Palaiseau 91128, France²Department of Biology, Université Paris-Sud, Orsay 91405, France³Department of Microbiology, Institut Pasteur, Unité Pathogénèse de *Helicobacter*, 28 rue du Dr. Roux, Paris 75724, France

ThyX is an essential thymidylate synthase that is mechanistically and structurally unrelated to the functionally analogous human enzyme, thus providing means for selective inhibition of bacterial growth. To identify novel compounds with anti-bacterial activity against the human pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*, based on our earlier biochemical and structural analyses, we designed a series of eighteen 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones (2-OH-1,4-NQs) that target *HpThyX*. Our lead-like molecules markedly inhibited the NADPH oxidation and 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate-forming activities of *HpThyX* enzyme *in vitro*, with inhibitory constants in the low nanomolar range. The identification of non-cytotoxic and non-mitotoxic 2-OH-1,4-NQ inhibitors permitted testing their *in vivo* efficacy in a mouse model for *H. pylori* infections. Despite the widely assumed toxicity of naphthoquinones (NQs), we identified tight-binding ThyX inhibitors that were tolerated in mice and can be associated with a modest effect in reducing the number of colonizing bacteria. Our results thus provide proof-of-concept that targeting ThyX enzymes is a highly feasible strategy for the development of therapies against *H. pylori* and a high number of other ThyX-dependent pathogenic bacteria. We also demonstrate that chemical reactivity of NQs does not prevent their exploitation as anti-microbial compounds, particularly when mitotoxicity screening is used to prioritize these compounds for further experimentation.

1. Introduction

De novo synthesis of 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP or thymidylate) is essential for cellular survival. Consequently, inhibiting the methylation reaction of 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP) to dTMP by thymidylate synthases (TS) provides a powerful means for controlling the growth of eukaryotic or bacterial cells. This is illustrated by the development of several chemotherapeutic agents that target thymidylate biosynthesis. For instance, fluoropyrimidines (e.g. 5-fluorouracil and capecitabine) and antifolates (e.g. methotrexate and pemetrexed), which target human TS, are successful drugs used in cancer chemotherapy [1]. Moreover, methotrexate and trimethoprim target dihydrofolate reductase (DHFR) that is also required for efficient thymidylate synthesis in many eukaryotes, including pathogenic parasites and bacteria [2,3].

Human TS belongs to the ThyA family of enzymes (EC 2.1.1.45) that uses *N*⁵,*N*¹⁰-methylene-5,6,7,8-tetrahydrofolate (CH₂H₄folate) in a reductive methylation reaction [4]. In this reaction, tetrahydrofolate (H₄folate) reduces the methylene moiety after its transfer to the uracil ring, thus resulting in the formation

of dihydrofolate (H₂folate). The second distinct family of TS, ThyX proteins (EC 2.1.1.148; flavin-dependent thymidylate synthase), uses a non-covalently bound flavin adenine dinucleotide (FAD) cofactor to facilitate hydride transfer from NAD(P)H [5–8]. Consequently, the end product of ThyX catalysis is H₄folate, explaining why ThyX-containing bacteria (~30% of all bacterial species) do not require DHFR FoaA that recycles H₂folate to H₄folate in actively dividing *thyA*-carrying cells [9,10].

Several observations have established essential ThyX proteins as highly relevant drug targets [11–13]. They are found in a large number of human pathogenic bacteria (electronic supplementary material, table S1), including *Helicobacter pylori* (HpThyX) and *Mycobacterium tuberculosis* (MtbThyX), but are absent in humans. Moreover, the structure and mechanisms of ThyA and ThyX proteins are strikingly different, a fact that greatly facilitates the development of specific ThyX inhibitors that do not act on human TS [11–14]. The key feature of the active site of ThyX proteins is its location in a large and flexible cavity at the interface of three subunits of the ThyX homotetramer. This location allows surface exposure of the N5 atom of the flavine isoalloxazine ring that, at the millisecond time scale, is involved in hydride transfer [15]. As the hydride transfer to ThyX-bound FAD from NAD(P)H is either strictly dependent on or activated by the nucleotide substrate dUMP, this renders ThyX inhibitors that are competitive with respect to dUMP selective within the bacterial cell. Indeed, we previously identified non-substrate-based, tight-binding ThyX inhibitors that inhibited growth of genetically modified *Escherichia coli* cells carrying *thyX*. The observed pattern of inhibition mimics a genetic knockout of TS [11], indicating selective *in vivo* targeting. The co-crystal structure of one such inhibitor—2-hydroxy-3-(4-methoxybenzyl)-1,4-naphthoquinone (the molecule C8-C1)—revealed binding within the conserved active site, partially overlapping with the dUMP-binding pocket. In addition to our inhibitor studies on ThyX proteins, several dUMP analogues have also been described that inhibit MtbThyX at micromolar concentrations [12,13,16]. Importantly, recent studies have also indicated that 5-fluoro-dUMP, a metabolite of fluorouracil, selectively inhibits ThyX in living cells of *M. tuberculosis* [17].

The fact that naphthoquinones (NQs) inhibit ThyX proteins is of great interest, as biological activities of these compounds are widely reported. For instance, the anti-cancer activity of plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone), a natural naphthoquinone derivative isolated from *Plumbago* or *Dyospiro* sp., has been observed in cell cultures, as well as in animal models [18,19]. This molecule and dyospirin (a dimeric analogue of plumbagin) have also shown anti-microbial activity against different pathogens, including *M. tuberculosis* [20–22]. Moreover, atovaquone (2-(trans-4-(*P*-chlorophenyl)-cyclohexyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone), a well-known 2-OH-1,4-NQ (Malarone, GlaxoSmithKline), targets the respiratory electron transfer chain, and is clinically used in anti-pneumocystis, anti-toxoplasmosis and anti-malarial treatments [23]. Recently, NQ-based inhibitors of DNA gyrase with a novel mechanism of action have also been described [24]. Despite these remarkable observations, the further use of NQs in biomedical applications has been hindered by their redox activity and widely assumed toxicity [25–28].

The first flavin-dependent TS to be biochemically characterized was the ThyX enzyme from *H. pylori* [9]. This spiral-shaped, Gram-negative bacterium infects the gastric mucosa

of about half of the world's population, and is associated with chronic gastritis, peptic ulcers and gastric carcinoma [29]. Here, we report on the identification of the new 2-OH-1,4-NQ derivatives with relatively low cyto- and mitotoxicity. These molecules display a potent inhibition of *H. pylori* ThyX activity. Some of these ThyX inhibitors are well tolerated, and one of them has shown modest but significant activity in an animal model of infection. We expect that our results will not only significantly speed up thymidylate synthase-based anti-microbial discovery approaches, but will also increase the interest in biological activities of NQs.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

The 2-OH-1,4-NQ derivatives designed and used in this study (figure 1a) were synthesized by Roowin (Riom, France). Purity of the compounds (more than 95%) was confirmed by HPLC analyses using detection at 254 nm. ¹H NMR and mass spectrometry (ESI+) were used to confirm the conformity of the synthesized molecules. Aqueous solubility (log_{S_w}) of the compounds was estimated using the Yalkowsky formula log_{S_w} = 0.8–0.01(MP – 25) – log_P, with MP being an experimentally determined melting point of the compound. Concentrated stock solutions (10 mg ml^{–1}) of the different compounds were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). For mouse infection and treatment, the compounds were dissolved in 2% β-cyclodextrine. All other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich: ampicillin (A0166), amphotericin B (A4888), atovaquone (A7986), β-cyclodextrine (C4767), DMSO (D2650), FAD (F6625), NADPH (N7505), polymyxin B (P4932), rotenone (R8875), dUMP (D3876) and vancomycin (V2002). CH₂H₄folate was provided by Eprova, Merck.

2.2. *Helicobacter pylori* strains and growth conditions

Helicobacter pylori strains used in this study were 26695 and the mouse-adapted strain SS1 [30,31]. *Helicobacter pylori* strains were grown on Blood Agar Base 2 (Oxoid) plates supplemented with 10% defibrinated horse blood, or in Brain Heart Infusion liquid medium (Oxoid), supplemented with 8% decomplexed fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) with an antibiotic–fungicide mix consisting of vancomycin (final concentration 12.5 μg ml^{–1}), polymyxin B (0.31 μg ml^{–1}) and amphotericin B (2.5 μg ml^{–1}). *Helicobacter pylori* was grown at 37°C under microaerophilic conditions obtained using the CampyGen system (Oxoid).

2.3. Cytotoxicity and mitotoxicity of 2-OH-1,4-NQ compounds

Cytotoxicity of the 2-OH-1,4-NQ derivatives was assessed by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release following manufacturer's instructions (Cytotoxicity Detection Kit; Roche Applied Sciences). Briefly, AGS cells (human gastric adenocarcinoma cell line; ATCC Catalog no. CRL-1739TM) were cultured in Ham's F-12 K medium containing 1% of FBS. A total of 3 × 10⁴ cells were added per well in a sterile 96-well tissue culture plate. Cells were then treated with different doses of 2-OH-1,4-NQ compounds ranging from 0.78 to 50 μg ml^{–1}. After a 24 h incubation at 37°C (5% CO₂, 90%

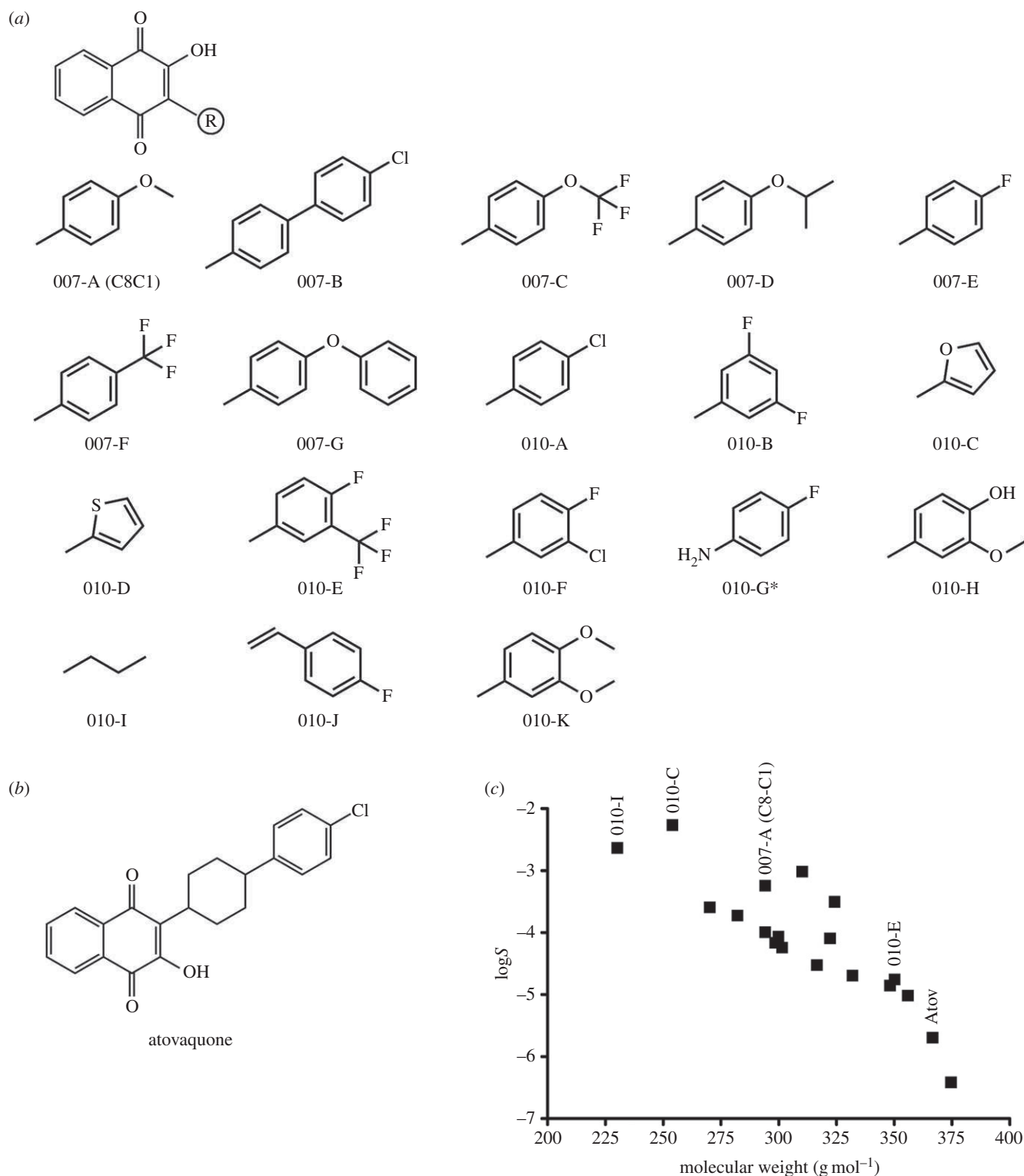


Figure 1. (a) Chemical structures of 2-OH-1,4-NQ derivatives tested in this study. Asterisk refers to the fact that molecule 010-G has a chloride (and not hydroxyl) at position 2. (b) Chemical structure of 2-(trans-4-(4-chlorophenyl)cyclohexyl)-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (atovaquone). (c) Predicted $\log S$ values (aqueous solubility) of the different drugs versus their molecular weight (g mol^{-1}). The four molecules selected for *in vitro* testing (figure 4) and for mouse experiments (figure 6) are indicated above their symbol (filled squares). Atov, atovaquone.

humidity), the microplates were centrifuged at 250g for 10 min, and the supernatants were carefully removed and transferred into optically clear 96-well microplates (Greiner Bio-One). The dye solution containing iodotetrazolium chloride and sodium lactate was then added to each well to quantify the amount of LDH released into the extracellular medium. LDH was quantified by measuring the A_{490} using a PowerWave Microplate Spectrophotometer (BioTek).

Mitochondrial toxicity (mitotoxicity) was assessed by measuring resazurin (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) reduction by following absorption changes at 570 nm (Mitochondrial Viability Assay; Abcam). Resazurin is an indicator dye that reports on oxidation–reduction reactions taking place in the mitochondria of living cells. AGS cells ($\approx 2.5 \times 10^5$ cells well⁻¹) cultured in a DMEM galactose/glutamine-supplemented medium were seeded in sterile white-walled

96-well clear-bottom microplates and treated for 4 h with different doses of 2-OH-1,4-NQ compounds ranging from 0.78 to 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Addition of the stain solution was followed by a further 4 h incubation at 37°C (5% CO₂, 90% humidity) and A₅₇₀ was measured. Rotenone, an inhibitor of the mitochondrial respiratory chain complex I, was used as a positive control.

2.4. Anti-microbial susceptibility testing: disc diffusion method and minimal inhibitory concentration values

The *in vitro* anti-bacterial activity of 2-OH-1,4-NQ compounds was assessed against the 26695 and SS1 strains of *H. pylori*. DMSO was used as control in all experiments.

Disc diffusion tests were performed in triplicate, including a DMSO-only control on each plate, as specified in the electronic supplementary material. Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined using a broth micro-dilution test in 24-well microtitre plates. For test inocula, an overnight preculture of *H. pylori* strains 26695 and SS1 was diluted to an OD₆₀₀ of approximately 0.1 and 0.5 ml of this suspension was transferred to each well. Ten microlitres of twofold serial dilutions of each compound in DMSO, ranging in concentration from 0.625 to 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$, were added and the covered plates were incubated for 24 h at 37°C with orbital shaking at 140 r.p.m. under microaerophilic conditions. The MIC was determined as the lowest compound concentration resulting in full growth inhibition after 24 h of incubation. All the tests were done in triplicate, including cell-free and DMSO-only controls.

To determine the bactericidal activity of C8-C1 against *H. pylori*, liquid BHI medium was inoculated with an overnight culture of *H. pylori* 26695 at an initial OD₆₀₀ of 0.1. C8-C1 or chloramphenicol, used as bacteriostatic control, were added after 4 h of culture time at final concentrations of 5 and 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$. To determine the viable counts of surviving bacteria (colony forming units, CFU), aliquots of culture were then plated in triplicate on blood agar plates after 3 and 24 h exposure.

2.5. Protein production and purification

Escherichia coli strain BL21 (*fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS*), carrying *HpthyX* on plasmid pGL2 under the control of a pBAD promoter, was grown at 37°C on solid or liquid Luria Bertani medium [9]. This strain was used for overproduction and purification of *HpThyX* tagged with six histidine residues [32]. The protein was purified by affinity chromatography on a 5 ml resin HiTrap TALON column (GE Healthcare) using a linear imidazole gradient. Imidazole was removed using a PD-10 column (Bio-Rad). Concentrated fractions were pooled and stored at -80°C in 30 mM HEPES (pH 8.0), NaCl 300 mM, glycerol 10% (v/v). The concentration of purified proteins was determined by the Bradford method (Bio-Rad). A₄₅₀ values were used to detect FAD bound to purified *ThyX* proteins.

2.6. Thyx activity measurements

HpThyX activity was assessed by measuring either deprotonation of [5-³H]dUMP or NADPH oxidation activities [11,32].

In the tritium release (deprotonation) assays, typical reactions contained 10 mM MgCl₂, 10% (v/v) glycerol, 500 μM FAD, 2 mM NADPH, 1 mM CH₂H₄Folate and 10 mM β -mercaptoethanol in 50 mM HEPES (pH 8). Different concentrations of dUMP were also included in the reaction mixtures. The specific activity of tritiated [5-³H]dUMP (diammonium salt) stock was 15–30 Ci mmol⁻¹ (Moravek Biochemicals, CA, USA). 2-OH-1,4-NQ derivatives were prepared at 100 μM in 1% DMSO. Reactions were initiated by adding the enzyme (10 μM) and were stopped after 20 min incubation at 37°C.

NADPH oxidation assays were performed at 37°C in 96-well plates (Greiner Bio-One). One hundred microlitres of reaction mixture contained HEPES 50 mM (pH 8.6), NaCl 150 mM, FAD 50 μM , β -mercaptoethanol 1.43 mM, NADPH 500 μM and 10 μM of purified *HpThyX*. dUMP and 2-OH-1,4-NQ concentrations were varied across 12.5–200 μM and 0.3–100 μM , respectively. Microtitre plates were prepared and transferred to the microplate reader Chameleon II (Hidex). The reactions were started by automatically injecting NADPH into individual wells and *ThyX* activity was determined by following a decrease in absorbance at 340 nm. A molar extinction coefficient of 6220 M⁻¹ cm⁻¹ at 340 nm (ϵ_{340}) was used to quantify NADPH oxidation. Samples with added DMSO and enzyme-free reactions were used as positive and negative controls, respectively.

2.7. Thyx docking methodology

The *H. pylori* *ThyX* protein structure (PDB code 3AH5 [33,34]) was processed by PYMOL software [35] to remove water molecules and the C:dUMP cofactor. Polar hydrogen atoms were added and atomic partial charges were assigned using the PYMOL VINA plugin [36]. The residues A:Arg197, C:Arg109 and C:Tyr110 were chosen to be flexible during docking performed with the VINA software [37]. A cubic search volume of 25 × 25 × 25 Å centred on A:FAD N5 atom was defined and the lowest predicted energy conformation was kept for analysis.

2.8. Mouse infection and treatment

NMRI-specific pathogen-free mice (Charles River Laboratories) were orogastrically inoculated with 10⁸ CFU of the *H. pylori* mouse-adapted strain SS1, prepared in 100 μl of peptone broth. Four groups of six to eight mice were infected by *H. pylori* strain SS1. Earlier experiments have established that after one week, colonization of mice is fully established [38]. A negative control group of five mice was inoculated with peptone broth alone and was not colonized by *H. pylori*. One week after infection, three groups of mice were treated orogastrically three times a day with 500 μl of either compound 010-C, 010-E or 010-I dissolved in 2% β -cyclodextrin at 0.25 mg ml⁻¹ (0.375 mg mouse d⁻¹) during one week. As a control, the fourth group of mice was treated orogastrically three times a day by the same amount of 2% β -cyclodextrin (17.6 mM), the vehicle of the compounds. Administered particles had a hydrodynamic radius of 180–200 nm and their size and monodispersity were measured using dynamic light scattering (Malvern Instruments, Zetasizer Nano-S instrument). This average size is in agreement with the average size of β -cyclodextrin particles that self-aggregate in water at a concentration of

12 mM [39]. After treatment, viable *H. pylori* cells, colonizing the mouse stomach, were enumerated by culture of serial dilutions of homogenized tissue on blood agar plates containing bacitracin ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) and nalidixic acid ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) as in [40].

3. Results

3.1. Optimization and custom-synthesis of new 2-OH-1,4-NQ compounds

To identify novel compounds targeting the ThyX enzyme of *H. pylori* (*HpThyX*), we designed a series of 2-OH-1,4-NQ derivatives using the commercial molecule C8-C1 (or its resynthesized version 007-A) as starting point (figure 1). This molecule was identified earlier as selective ThyX inhibitor with cellular activity against genetically modified *E. coli* strains [11]. Mass spectrometry and ^1H NMR analyses confirmed the molecular structures of the NQ derivatives indicated in figure 1*a*. All molecules tested in further experiments were more than 95% pure based upon HPLC analyses using detection at 254 nm. Molecular weight and predicted $\log P$ values of these molecules ranged from 230 to 375 Da and 1.85 to 5.2, respectively (electronic supplementary material, table S2). Aqueous solubility, a key factor determining the ADME-Tox properties of small molecules, was estimated using the Yalkowsky formula (see Material and methods) relying on experimentally determined melting points and calculated $\log P$ values. These calculations predict that the aqueous solubility of the compounds varies from $\approx 40 \mu\text{M}$ to $\approx 2 \text{ mM}$ (figure 1*c*). It is of note that most of these molecules are predicted to be considerably more soluble than the closely related atovaquone, a commercially available anti-malarial compound targeting the mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex (figure 1*b,c*).

3.2. *Helicobacter pylori* growth is inhibited by 2-OH-1,4-NQ derivatives targeting *HpThyX*

Using semi-quantitative deprotonation assays that detect proton release from $[5\text{-}^3\text{H}]\text{dUMP}$ during ThyX catalysis, the effect of these 2-OH-1,4-NQ compounds against *HpThyX* was investigated. Table 1 shows that all molecules substantially inhibited ThyX activity at micromolar concentrations. The susceptibility of *H. pylori* to these compounds was determined using the disc diffusion method (electronic supplementary material, figure S2) and via the determination of MICs (table 1; broth microdilution test). Overall, both tests gave similar results, indicating anti-*pylori* activity against both strains 26695 (wild-type strain) and SS1 (mouse-adapted strain) at micromolar concentrations (typical MIC-values ranging from 0.625 to $10 \mu\text{g ml}^{-1}$). When *H. pylori* liquid cultures were exposed to C8-C1 for up to 24 h, no viable cells were recovered after replating on solid media lacking this compound (figure 2), indicating that the anti-microbial activity of the C8-C1 compound is bactericidal. Expectedly, chloramphenicol behaved as bacteriostatic agent under these conditions (figure 2). The molecule 010-G, where a hydroxyl group at the position 2 was replaced with a chlorine, was very active in liquid cultures (MIC $\sim 0.625 \mu\text{g ml}^{-1}$), but

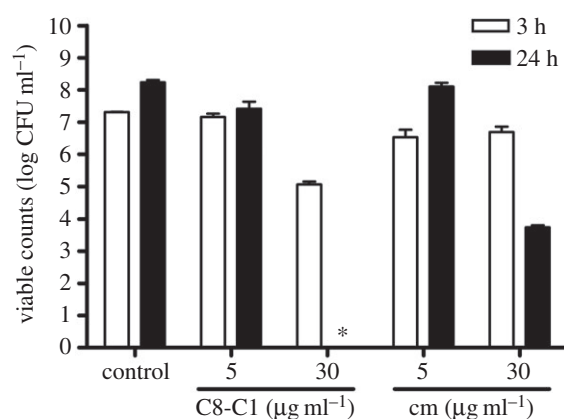


Figure 2. Effect of C8-C1 on the *in vitro* growth of *H. pylori* strain 26695. Chloramphenicol, a well-known bacteriostatic antibiotic, was used as control. CFUs were determined after 3 h or 24 h exposure. The asterisk indicates that no growth was observed.

Table 1. *In vitro* and biological activity of 2-OH-1,4-NQ compounds against *HpThyX* and *H. pylori*, respectively.

molecule	inhibition against ThyX (% remaining activity relative to control)	minimal inhibitory concentration (MIC)	
		strain 26695 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) (μM)	strain SS1 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) (μM)
007-A (C8C1)	38.5	10 (33.98)	10 (33.98)
007-B	60.2	10 (26.68)	10 (26.68)
007-C	62.5	5 (13.01)	5 (13.01)
007-D	45.7	≥ 20 (62.03)	20 (62.03)
007-E	66.3	10 (35.42)	10 (35.42)
007-F	60.6	5 (15.06)	10 (15.06)
007-G	61.8	20 (56.16)	5 (14.04)
010-A	49.5	10 (33.48)	5 (16.74)
010-B	74.3	10 (33.30)	10 (33.30)
010-C	76.4	10 (39.34)	10 (39.34)
010-D	36.4	10 (37.00)	10 (37.00)
010-E	77.7	5 (14.27)	5 (14.27)
010-F	74.5	10 (31.58)	5 (15.79)
010-G	21.1	0.625 (2.07)	0.625 (2.07)
010-H	57.8	20 (64.45)	10 (32.23)
010-I	64.3	10 (43.42)	10 (43.42)
010-J	49.7	2.5 (8.49)	2.5 (8.49)
010-K	75.1	20 (61.67)	10 (30.84)

inactive in disc diffusion tests, due to limited diffusion of the compound from its filter.

3.3. *In vitro* cytotoxicity and mitotoxicity tests

NQs are known to possess biological activities against different cell types, prompting us to investigate the possible

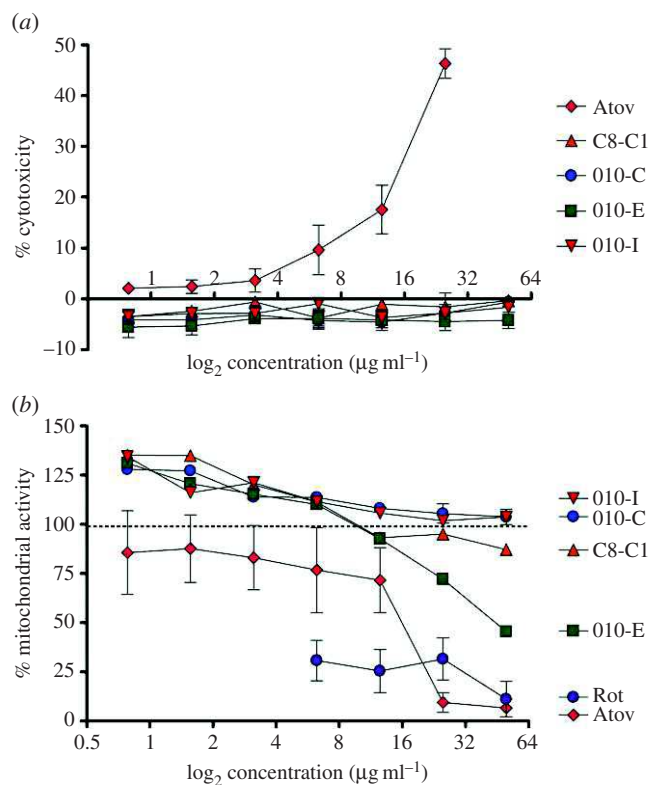


Figure 3. (a) Cytotoxic and (b) mitotoxic effects of 2-OH-1,4-NQ compounds. Atovaquone (Atov) and rotenone (Rot) were used as positive controls.

cytotoxicity of the synthesized compounds, using atovaquone as control. The cytotoxicity of the compounds was determined by measuring LDH release from AGS cells, a human gastric adenocarcinoma cell line, as is detailed in Material and methods. These experiments revealed that the majority of the compounds are either non-cytotoxic in the concentration range tested or are less cytotoxic than atovaquone, which at 25 µg ml⁻¹ had a cytotoxic effect of $48 \pm 5\%$ (figure 3a; electronic supplementary material, figure S3A). This result is similar to what has been described previously for atovaquone in human hepatic HL-7702 cells [26]. The molecule 010-G with a potent anti-microbial activity was found to be cytotoxic and was not studied further in this study (electronic supplementary material, figure S3).

The mitotoxicity of these compounds was assessed by measuring NADPH/NADH-dependent resazurin reduction by the mitochondria of living AGS cells (figure 3b). Rotenone and atovaquone, which target complexes I and III of the mitochondrial respiratory chain, respectively, were used as positive controls. These experiments revealed that the cytotoxic compounds identified above target the mitochondrial respiratory chain (electronic supplementary material, figure S3B), whereas the non-cytotoxic inhibitors were also found to be non-mitotoxic (figure 3).

3.4. *In vitro* testing of 2-OH-1,4-NQ derivatives against ThyX from *Helicobacter pylori*

To investigate the inhibitory potential of the molecules 007-A (C8-C1), 010-C, 010-E and 010-I against *HpThyX* in more detail, we used a quantitative tritium release assay (see Material and methods). These molecules were chosen for more detailed studies because they were found to be non-

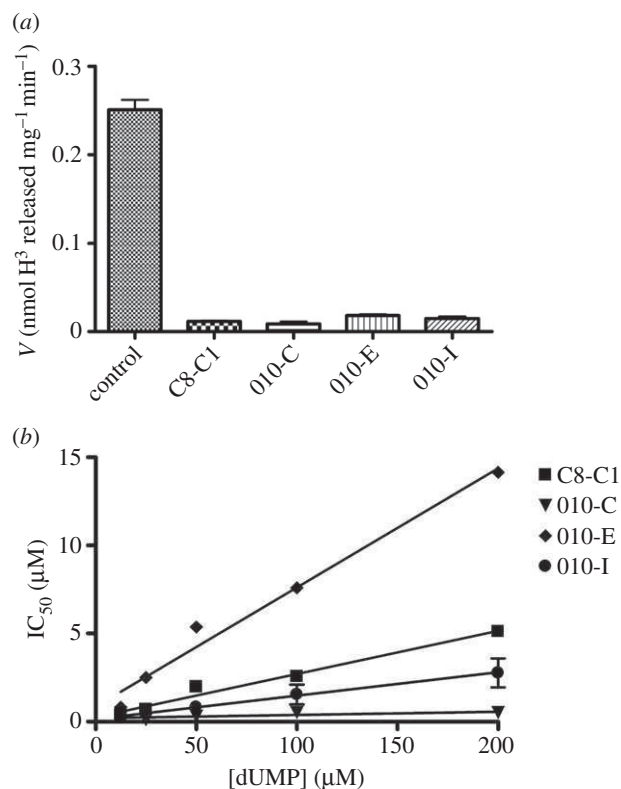


Figure 4. *HpThyX* inhibition *in vitro*. (a) Deprotonation assays using 10 µM of enzyme and 100 µM of different drugs. (b) Determination of IC₅₀ values for different compounds as a function of the dUMP concentration. NADPH oxidation assays were used for activity measurements.

cytotoxic and non-mitotoxic in our assays. We first showed that these molecules suppressed the dTMP-forming activity at a compound concentration of 100 µM using 10 µM of ThyX enzyme (figure 4a). Using the same set of compounds in NADPH oxidation assays, our results revealed that IC₅₀ values varied linearly as a function of the dUMP concentration (figure 4b). The observed linear correlation with a positive slope is indicative of the molecules tested acting as tight-binding competitive inhibitors with respect to dUMP. From the slope of these curves, we estimate K_i -values of 1000, 367, 258 and 28 nM for the molecules 010-E, C8-C1, 010-I and 010-C, respectively. Thus, our chemical series allowed a 10-fold improvement of the inhibitor affinity towards *H. pylori* ThyX proteins in comparison to the starting molecule C8-C1. Overall, our data indicate that the relatively small size and high lipophilicity of the R substitution at position 3 favours optimal inhibition of *H. pylori* ThyX. Molecular modelling of the inhibitory binding in the active site of *HpThyX* (figure 5) shows that binding in the vicinity of the catalytically crucial N5-atom of the FAD cofactor is highly feasible.

3.5. Mouse infection and treatment

The *in vivo* efficacy of the molecules 010-C, 010-E and 010-I was assessed by testing their effect on mouse colonization by *H. pylori* (figure 6). The molecules were dissolved in β-cyclodextrin at 2% adjusted to pH 7.5, a drug delivery vehicle known to be harmless towards mice and *H. pylori*. These non-mitotoxic molecules were chosen for animal experiments not only because of their appropriate log_S and log_P values for oral absorption, but also for their markedly

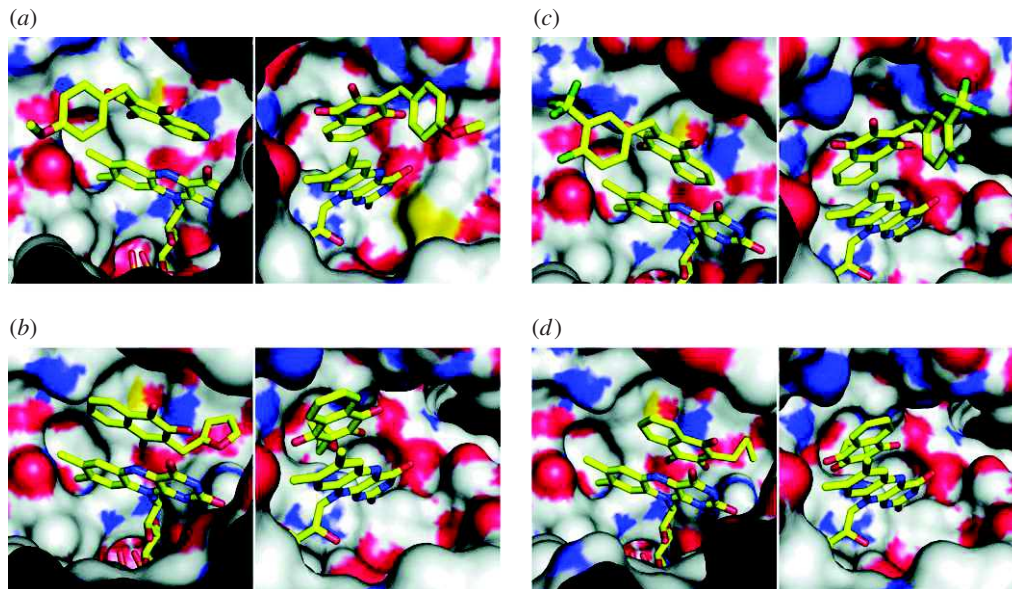


Figure 5. Three-dimensional modelling of *HpThyX*–inhibitor complexes using AUTODOCK VINA. FAD and *HpThyX* inhibitor are depicted in stick representations with carbon, oxygen, nitrogen and fluorine atoms coloured in yellow, red, blue and green, respectively. The *HpThyX* surface is shown with carbon, oxygen, nitrogen and sulfur atoms coloured grey, red, blue and yellow, respectively. Some amino acids were removed for clarity. Two orientations, separated by a 90° rotation along the *y*-axis, are shown. (a) 007-A (C8-C1). (b) 010-C. (c) 010-E. (d) 010-I.

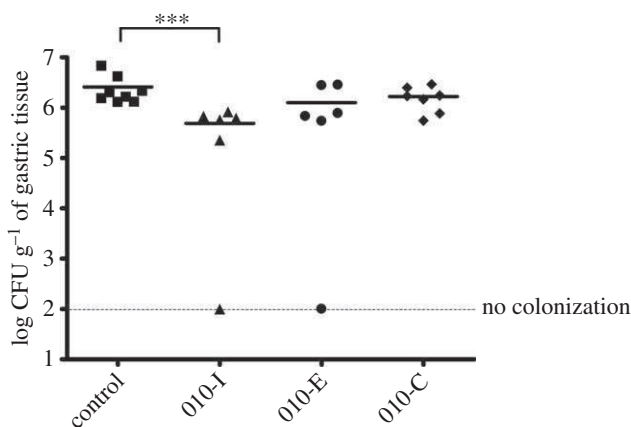


Figure 6. Gastric colonization of NMRI mice infected with *H. pylori* strain SS1 after treatment with three 2-OH-1,4-NQ compounds: 010-C, 010-E and 010-I. Mice were sacrificed two weeks after inoculation, including one week of orogastric treatment with the compounds. Each symbol corresponds to the *H. pylori* colonization load in the gastric mucosa of a single mouse. Squares correspond to infected mice treated with 2% β -cyclodextrin (vehicle control), triangles, circles and diamonds refer to infected mice treated with compounds 010-I, 010-E and 010-C, respectively. The horizontal bars correspond to the geometric mean calculated for each group of mice. The dashed horizontal bar represents the detection limit of colonization. Differences in the bacterial loads were statistically analysed by the Mann–Whitney test (GraphPad, Prism), *** $p < 0.01$ (one-tail).

lower K_i -values when compared with the ‘parent’ molecule C8-C1. A previously established mouse model for following *H. pylori* infections was used for these experiments [40]. After an initial colonization period of one week, three groups of mice were treated orogastrically three times a day with 500 μ l of compounds 010-C, 010-E or 010-I at 0.25 mg ml⁻¹ (0.375 mg mouse day⁻¹) during one additional week. The dosage of these treatments was 17 mg kg⁻¹ of body weight, which is the same order of magnitude as antibiotics used for anti-*H. pylori* treatments. As a control, a

group of mice was orogastrically treated with the same amount of 2% β -cyclodextrin. None of the aforementioned treatments affected either the body or stomach weight of the mice (data not shown). After treatment, viable *H. pylori*, colonizing the stomach of the different groups of mice, were enumerated by culturing serial dilutions of homogenized tissue (figure 6). We observed a statistically significant (Mann–Whitney test, one-tail, $p = 0.0003$) decrease of 1.22 log (17-fold) in the colonization loads (geometric means) of mice that were treated with the molecule 010-I as compared with the mice treated with the vehicle alone.

4. Discussion

Helicobacter pylori infections are common, and are currently treated by either a classical triple therapy consisting of a combination of proton pump inhibitor (PPI) and two antibiotics, among them clarithromycin, amoxicillin and metronidazole or, alternatively, by the simultaneous administration of PPI, bismuth, tetracycline and metronidazole. Resistance to all of these antibiotics except amoxicillin is frequent among clinical strains of *H. pylori*. For instance, in Europe, the resistance rates for adults reach 17.5% for clarithromycin and 35% for metronidazole, thus justifying the search for new anti-microbial compounds with activity against *H. pylori* cells [41].

The TS from *H. pylori* and humans are mechanistically and structurally very distinct, thus prompting for the development of new anti-microbial compounds specifically targeting *HpThyX*. Towards this goal, we designed a set of eighteen 2-OH-1,4-NQ derivatives that are closely related to atovaquone, a clinically used anti-malarial compound (figure 1). Despite considerable variations in predicted solubility, hydrophobicity and size (electronic supplementary material, table S2), all 18 molecules acted as *ThyX* inhibitors *in vitro* under semi-quantitative assay conditions (table 1). Molecules 007-A (=C8-C1), 010-C, 010-E and 010-I were then selected for a more quantitative study (figure 4).

Overall, our experiments resulted in identification of *HpThyX* inhibitors with nanomolar K_i -values and provided additional insight into further optimization. In all the structural models obtained (figure 5), the binding modes of the inhibitor and dUMP are similar, thus providing a plausible explanation for the simultaneous inhibition of NADPH oxidation and deprotonation activities. Thus, this mechanism of inhibition is not the result of the redox or chemical reactivity of NQs, but rather a direct effect of blocking a binding of a catalytic activator dUMP. Thus, binding of the inhibitor in the vicinity of the FAD cofactor first prevents activation of the NADPH oxidation/FAD reduction and, second, the binding of the substrate that receives a carbon from $\text{CH}_2\text{H}_4\text{folate}$ is blocked [15]. The docked configuration for the molecules C8-C1 and 010-C is very similar to that observed in crystal structures of the PBCV-1 enzyme [11].

We moreover demonstrated that these compounds have a potent and concentration-dependent anti-microbial activity against two different strains of *H. pylori* grown in liquid or solid medium (MIC-values in the range 0.625–20 $\mu\text{g ml}^{-1}$; table 1). In addition, this anti-microbial activity is bactericidal, as the number of viable cells drastically diminished when *H. pylori* cultures were continuously exposed to the molecule C8-C1 (figure 2). To date, our attempts to identify mutants that are resistant to these compounds were unsuccessful when using compound concentrations that inhibit growth on solid media, suggesting that these molecules may have several targets in bacterial cells. To exclude that the biological activities of our molecules simply resulted from non-specific redox activity or chemical reactivity, we performed cytotoxicity and mitotoxicity tests. These studies identified several new 2-hydroxy-1,4-naphthoquinones (2-OH-1,4-NQs) that were substantially less cytotoxic than atovaquone and an order of magnitude more potent *HpThyX* inhibitors than the founding molecule C8-C1. We also showed that cytotoxic 2-OH-1,4-NQs (including atovaquone) targeted mitochondria in our assays (electronic supplementary material, figure S3). Interestingly, we found that the compounds 010-C, 010-E, 010-I and C8-C1 activated the mitochondrial metabolism at low concentrations (figure 3b), suggesting that under these conditions these non-cytotoxic compounds probably mediate electron transfer from NAD(P)H to resazurin and/or might have antioxidant activity similar to that of idebenone, a synthetic analogue of coenzyme Q10 [42].

The three compounds 010-C, 010-E and 010-I were chosen for animal experimentation because of their lack of cytotoxicity and high affinity against the target enzyme. To obtain insight into the *in vivo* activity of these three *HpThyX*

inhibitors, we investigated their effect in an *H. pylori* mouse model of infection. This model has been used in previous studies to validate the *in vivo* efficacy of *H. pylori* inhibitors. Two studies used the same mouse model set-up and the same *H. pylori* SS1 strain, one showing the *in vivo* efficacy of a metronidazole treatment to eradicate *H. pylori* [43], and a second one reporting the use of isopentenylloxycinnamyl derivatives to reduce the *H. pylori* colonization loads [44]. Despite widely assumed toxicity of NQs, we found that the three *ThyX* inhibitors tested were tolerated in mice. For the molecule 010-I, with relatively high predicted solubility, a statistically significant effect against whole cells of *H. pylori* was identified using the aforementioned animal model (figure 6). Although the observed *in vivo* effect remains modest (17-fold), we consider our observations a promising starting point for further small molecule optimization to improve, for example, solubility and bioavailability of this class of compounds.

In summary, we have characterized a series of new *HpThyX* inhibitors, allowing identification of non-mitotoxic NQs with high efficiency against the target enzyme. Our results provide proof-of-concept that targeting *ThyX* enzymes is a highly feasible strategy for the development of therapies against *H. pylori* and a high number of other *ThyX*-dependent pathogenic bacteria. Our results further underline that the widely assumed chemical reactivity of NQs does not necessarily prevent their exploitation as anti-microbial compounds, particularly when mitotoxicity screening is used to prioritize these compounds for further experimentation.

Ethics. Experiments in mice were carried out in strict accordance with the recommendations in the Specific Guide for the Care and the Use of Laboratory Animals of the Pasteur Institute, according to the European Directive (2010/63/UE) and the corresponding French law on animal experimentation (Arrêtés 19 April 1988). The protocol has been approved by the Committee of Central Animal Facility Board of the Pasteur Institute. The project was submitted and approved by the CETEA, Comité d'éthique en Expérimentation Animale of the Institut Pasteur (no. 2013-0051) and was submitted for final approval to the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (no. 00317).

Authors' contributions. S.S., H.d.R. and H.M. designed and supervised experiments. S.S., K.D., I.L., K.A. and J.B. provided reagents and performed experiments. J.-C.L. performed computational analyses. S.S., U.L., H.d.R. and H.M. wrote the manuscript.

Competing interests. We declare we have no competing interests.

Funding. This work was supported by the ANR project AMTHYX (ANR-10-EMMA-044-01) to H.M. and H.d.R.

Acknowledgement. We thank Dr H. Becker, Dr S. Barth and Dr S. Lagrange for helpful discussions.

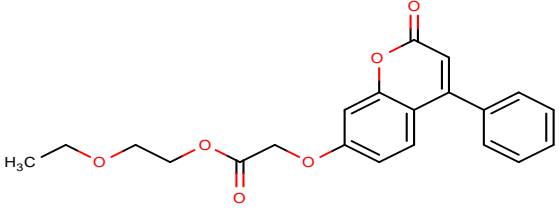
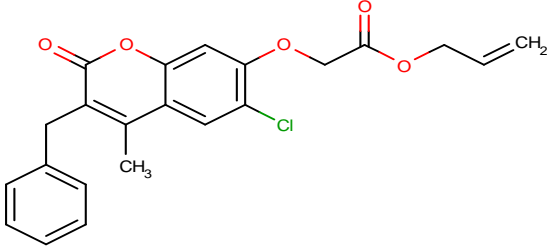
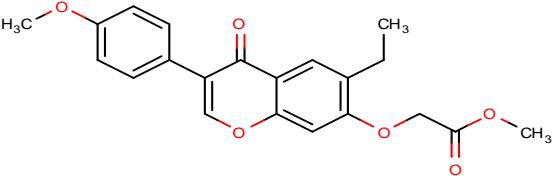
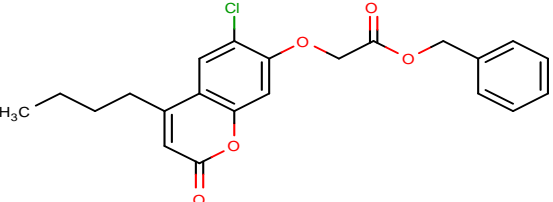
References

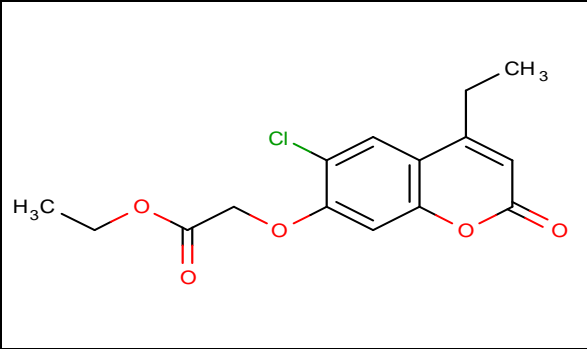
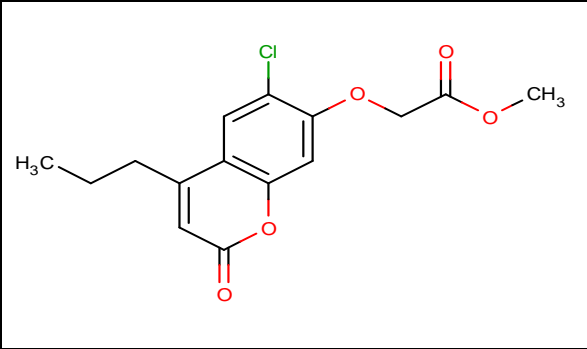
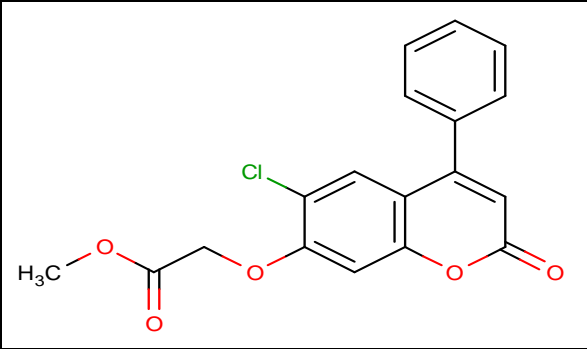
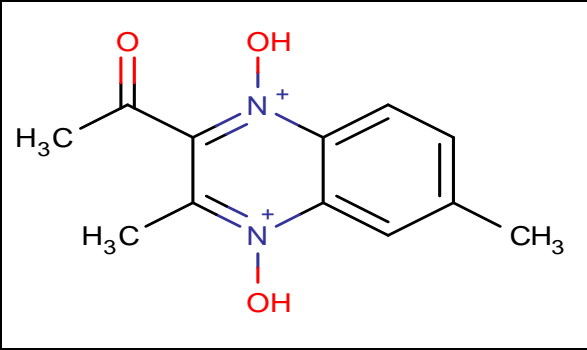
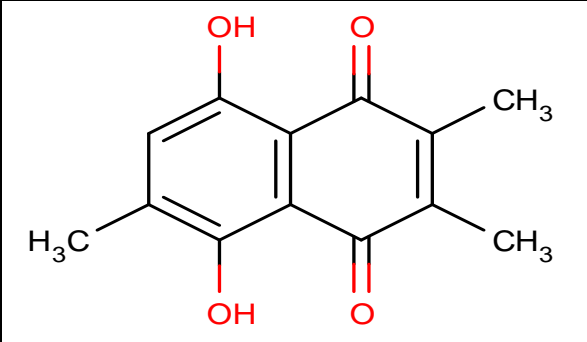
- Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz HJ, Ladner RD. 2014 Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **11**, 282–298. (doi:10.1038/nrclinonc.2014.51)
- Gangjee A, Kurup S, Namjoshi O. 2007 Dihydrofolate reductase as a target for chemotherapy in parasites. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 609–639. (doi:10.2174/138161207780162827)
- Hawser S, Lociuo S, Islam K. 2006 Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents. *Biochem. Pharmacol.* **71**, 941–948. (doi:10.1016/j.bcp.2005.10.052)
- Carreras CW, Santi DV. 1995 The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 721–762. (doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.003445)
- Gattis SG, Palfey BA. 2005 Direct observation of the participation of flavin in product formation by *thyX*-encoded thymidylate synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 832–833. (doi:10.1021/ja0432214)
- Graziani S *et al.* 2006 Catalytic mechanism and structure of viral flavin-dependent thymidylate synthase *ThyX*. *J. Biol. Chem.* **281**, 24 048–24 057. (doi:10.1074/jbc.M600745200)
- Koehn EM, Fleischmann T, Conrad JA, Palfey BA, Lesley SA, Mathews II, Kohen A. 2009 An unusual mechanism of thymidylate biosynthesis in organisms containing the *thyX* gene. *Nature* **458**, 919–923. (doi:10.1038/Nature07973)
- Mishanina TV, Koehn EM, Conrad JA, Palfey BA, Lesley SA, Kohen A. 2012 Trapping of an

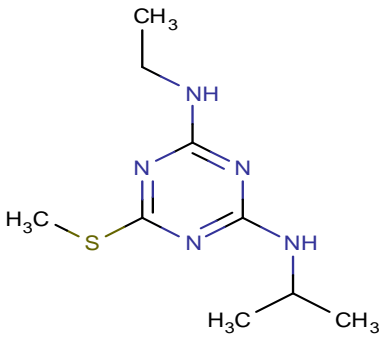
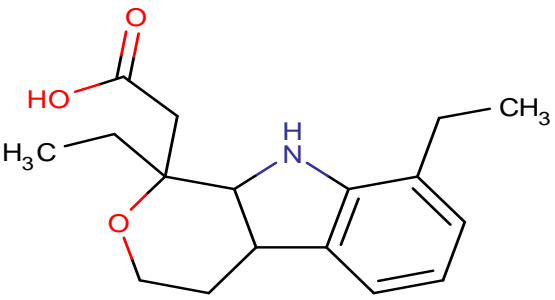
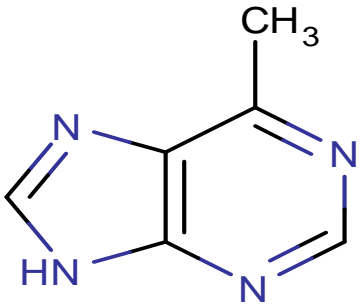
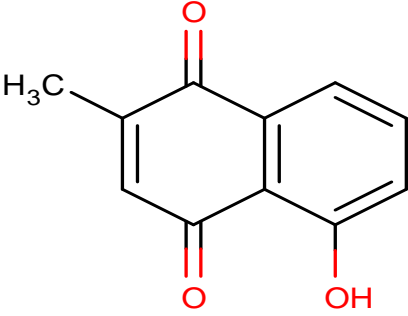
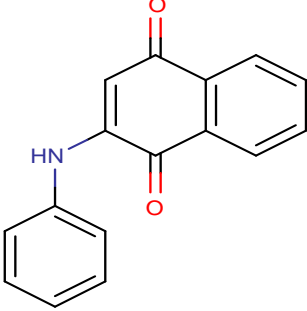
- intermediate in the reaction catalyzed by flavin-dependent thymidylate synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 4442–4448. (doi:10.1021/Ja2120822)
9. Myllykallio H, Lipowski G, Leduc D, Filee J, Forterre P, Liebl U. 2002 An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis. *Science* **297**, 105–107. (doi:10.1126/science.1072113)
 10. Myllykallio H, Leduc D, Filee J, Liebl U. 2003 Life without dihydrofolate reductase FolA. *Trends Microbiol.* **11**, 220–223. (doi:10.1016/S0966-842X(03)00101-X)
 11. Basta T *et al.* 2012 Mechanistic and structural basis for inhibition of thymidylate synthase ThyX. *Open Biol.* **2**, 120120. (doi:10.1098/rsob.120120)
 12. Kogler M, Busson R, De Jonghe S, Rozenski J, Van Belle K, Louat T, Munier-Lehmann H, Herdewijn P. 2012 Synthesis and evaluation of 6-Aza-2'-deoxyuridine monophosphate analogs as inhibitors of thymidylate synthases, and as substrates or inhibitors of thymidine monophosphate kinase in *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biodiv.* **9**, 536–556. (doi:10.1002/cbdv.201100285)
 13. Kogler M *et al.* 2011 Synthesis and evaluation of 5-substituted 2'-deoxyuridine monophosphate analogues as inhibitors of flavin-dependent thymidylate synthase in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Med. Chem.* **54**, 4847–4862. (doi:10.1021/Jm2004688)
 14. Mathews II, Deacon AM, Canaves JM, McMullan D, Lesley SA, Agarwalla S, Kuhn P. 2003 Functional analysis of substrate and cofactor complex structures of a thymidylate synthase-complementing protein. *Structure* **11**, 677–690. (doi:10.1016/S0969-2126(03)00097-2)
 15. Becker HF, Djaout K, Lamarre I, Ulmer JE, Schaming D, Bolland V, Liebl U, Myllykallio H, Vos MH. 2014 Substrate interaction dynamics and oxygen control in the active site of thymidylate synthase ThyX. *Biochem. J.* **459**, 37–45. (doi:10.1042/Bj20131567)
 16. Esra Onen F, Boum Y, Jacquement C, Spanedda MV, Jaber N, Scherman D, Myllykallio H, Herscovici J. 2008 Design, synthesis and evaluation of potent thymidylate synthase X inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**, 3628–3631. (doi:10.1016/j.bmcl.2008.04.080)
 17. Singh V *et al.* 2014 The complex mechanism of antimycobacterial action of 5-fluorouracil. *Chem. Biol.* **22**, 63–75. (doi:10.1016/j.chembiol.2014.11.006)
 18. Dandawate P *et al.* 2012 Synthesis, characterization, molecular docking and cytotoxic activity of novel plumbagin hydrazones against breast cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 3104–3108. (doi:10.1016/j.bmcl.2012.03.060)
 19. Dandawate P, Ahmad A, Deshpande J, Swamy KV, Khan EM, Khetmalas M, Padhye S, Sarkar F. 2014 Anticancer phytochemical analogs 37: synthesis, characterization, molecular docking and cytotoxicity of novel plumbagin hydrazones against breast cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **24**, 2900–2904. (doi:10.1016/j.bmcl.2014.04.100)
 20. Borges-Argaez R, Canche-Chay CI, Pena-Rodriguez LM, Said-Fernandez S, Molina-Salinas GM. 2007 Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoterapia* **78**, 370–372. (doi:10.1016/j.fitote.2007.03.004)
 21. Kuete V, Tangmouo JG, Meyer JJ, Lall N. 2009 Diospyrone, crassiflorone and plumbagin: three antimycobacterial and antigonorrhoeal naphthoquinones from two *Diospyros* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **34**, 322–325. (doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.04.008)
 22. Lall N, Das Sarma M, Hazra B, Meyer JJ. 2003 Antimycobacterial activity of diospyrin derivatives and a structural analogue of diospyrin against *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 435–438. (doi:10.1093/jac/dkg068)
 23. Baggish AL, Hill DR. 2002 Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1163–1173. (doi:10.1128/AAC.46.5.1163-1173.2002)
 24. Karkare S, Chung TT, Collin F, Mitchenall LA, McKay AR, Greive SJ, Meyer JJ, Lall N, Maxwell A. 2013 The naphthoquinone diospyrin is an inhibitor of DNA gyrase with a novel mechanism of action. *J. Biol. Chem.* **288**, 5149–5156. (doi:10.1074/jbc.M112.419069)
 25. Knecht W, Henseling J, Löffler M. 2000 Kinetics of inhibition of human and rat dihydroorotate dehydrogenase by atovaquone, lawsone derivatives, brequinar sodium and polyporic acid. *Chem. Biol. Interact.* **124**, 61–76. (doi:10.1016/S0009-2797(99)00144-1)
 26. Guo J, Song W, Ding F, Zhang J, Sun Z. 2012 Study on cytotoxicity and structure-activity relationship of HL-7702 cell exposed to naphthoquinones. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **33**, 408–413. (doi:10.1016/j.etap.2012.01.005)
 27. Pinho BR, Santos MM, Fonseca-Silva A, Valentao P, Andrade PB, Oliveira JM. 2013 How mitochondrial dysfunction affects zebrafish development and cardiovascular function: an *in vivo* model for testing mitochondria-targeted drugs. *Br. J. Pharmacol.* **169**, 1072–1090. (doi:10.1111/bph.12186)
 28. Birth D, Kao WC, Hunte C. 2014 Structural analysis of atovaquone-inhibited cytochrome bc1 complex reveals the molecular basis of antimalarial drug action. *Nat. Commun.* **5**, 4029. (doi:10.1038/ncomms5029)
 29. Salama NR, Hartung ML, Muller A. 2013 Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 385–399. (doi:10.1038/nrmicro3016)
 30. Tomb JF *et al.* 1997 The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* **388**, 539–547. (doi:10.1038/41483)
 31. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. 1997 A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* **112**, 1386–1397. (doi:10.1016/S0016-5085(97)70155-0)
 32. Leduc D, Graziani S, Lipowski G, Marchand C, Le Marechal P, Liebl U, Myllykallio H. 2004 Functional evidence for active site location of tetrameric thymidylate synthase X at the interphase of three monomers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 7252–7257. (doi:10.1073/pnas.0401365101)
 33. Zhang XL, Zhang JY, Mao XH, Zou QM, Hu YL, Wang DC. 2010 Crystallization and preliminary crystallographic studies of a flavin-dependent thymidylate synthase from *Helicobacter pylori*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 513–515. (doi:10.1107/S174430911000864x)
 34. Zhang XL, Zhang JY, Guo G, Mao XH, Hu YL, Zou QM. 2012 Crystal structure of a flavin-dependent thymidylate synthase from *Helicobacter pylori* strain 26695. *Prot. Pept. Lett.* **19**, 1225–1230. (doi:10.2174/092986612803217105)
 35. Schrödinger LLC. 2010 *The PyMOL molecular graphics system, v. 1.3r1*. New York, NY: Schrödinger LLC.
 36. Seeliger D, de Groot BL. 2010 Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **24**, 417–422. (doi:10.1007/s10822-010-9352-6)
 37. Trott O, Olson AJ. 2010 AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* **31**, 455–461. (doi:10.1002/jcc.21334)
 38. Bury-Mone S, Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H. 2001 Urel: a *Helicobacter pylori* protein essential for resistance to acidity and for the early steps of murine gastric mucosa infection. *Gastroenterol. Clin. Biol.* **25**, 659–663.
 39. Bonini M, Rossi S, Karlsson G, Almgren M, Lo Nostro P, Baglioni P. 2006 Self-assembly of beta-cyclodextrin in water. Part 1: cryo-TEM and dynamic and static light scattering. *Langmuir* **22**, 1478–1484. (doi:10.1021/la052878f)
 40. Skouloubris S, Thiberge JM, Labigne A, De Reuse H. 1998 The *Helicobacter pylori* Urel protein is not involved in urease activity but is essential for bacterial survival *in vivo*. *Infect. Immunol.* **66**, 4517–4521.
 41. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, Andersen LP, Goossens H, Glupczynski Y. 2013 *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut* **62**, 34–42. (doi:10.1136/gutjnl-2012-302254)
 42. Mordente A, Martorana GE, Minotti G, Giardina B. 1998 Antioxidant properties of 2,3-dimethoxy-5-methyl-6-(10-hydroxydecyl)-1,4-benzoquinone (idebenone). *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 54–63. (doi:10.1021/tx970136j)
 43. Jenks PJ, Ferrero RL, Tankovic J, Thiberge JM, Labigne A. 2000 Evaluation of nitrofurantoin combination therapy of metronidazole-sensitive and -resistant *Helicobacter pylori* infections in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2623–2629. (doi:10.1128/AAC.44.10.2623-2629.2000)
 44. da Silva CR, Michel V, Genovese S, Prevost MC, Epifano F, Touati E. 2012 Anti-*Helicobacter pylori* activities of natural isopentenylcinnamyl derivatives from *Boronia pinnata*. *Nat. Prod. Commun.* **7**, 1347–1350.

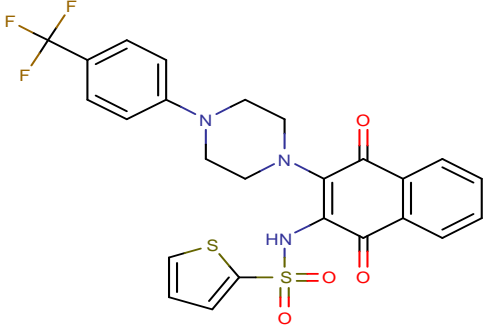
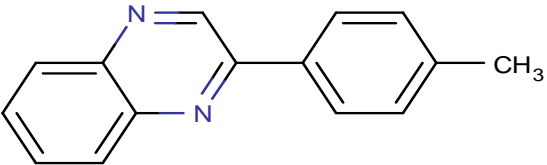
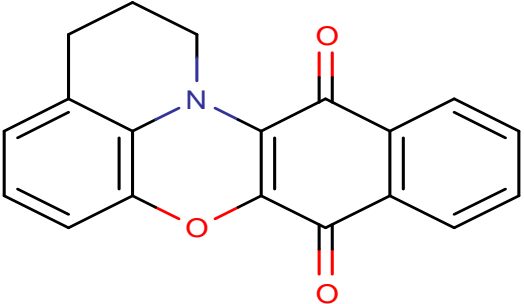
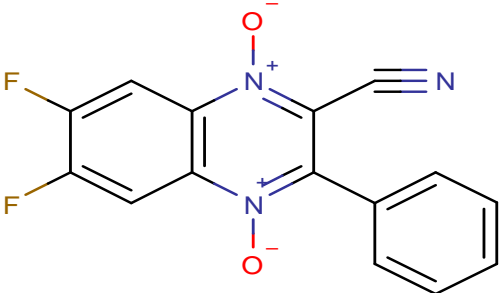
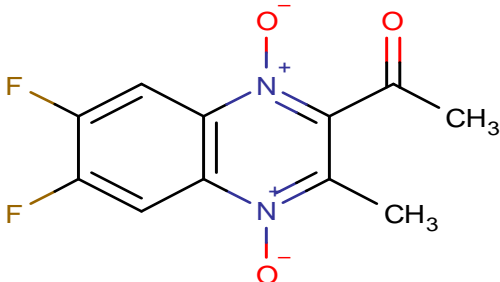
8. Annexe 2 : Résultat du crible de naphthoquinones

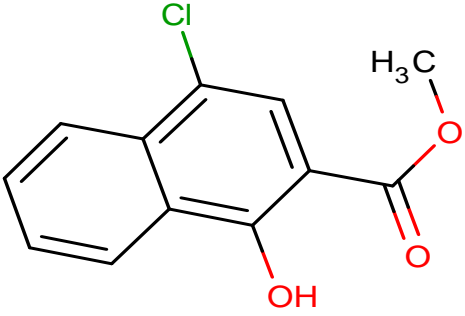
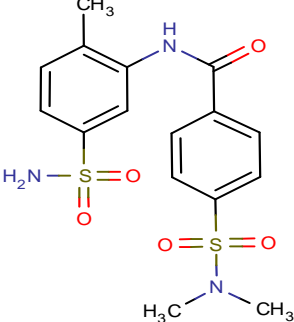
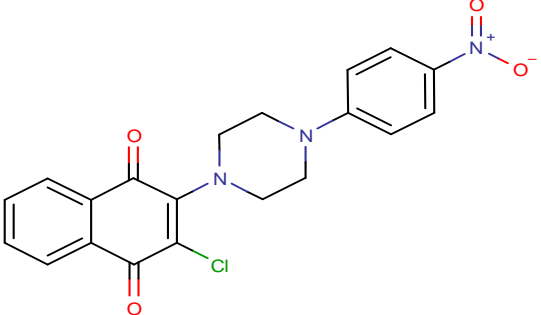
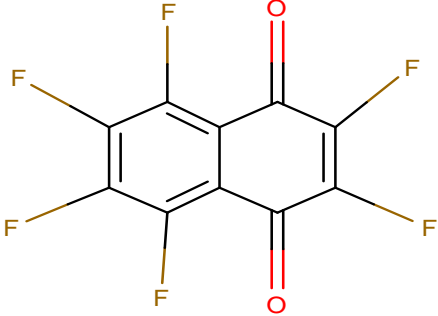
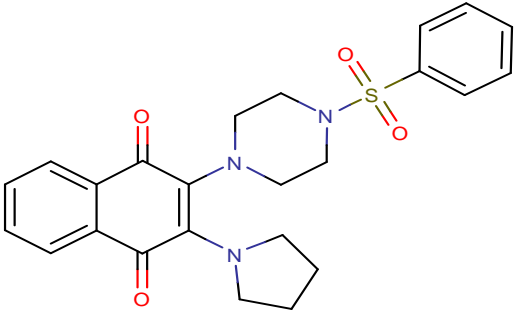
pour l'inhibition de ThyX *Mtb in vitro*

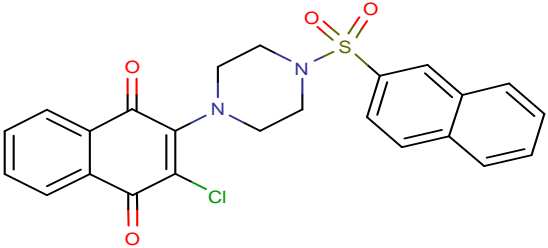
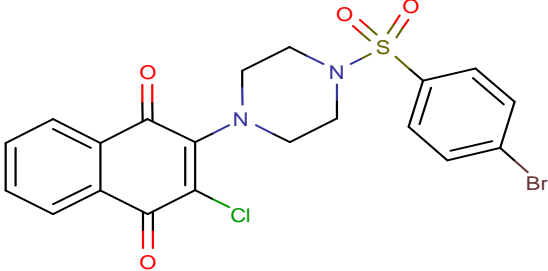
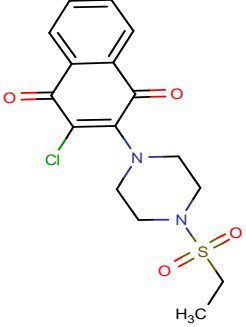
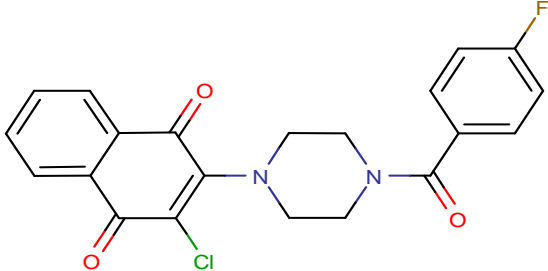
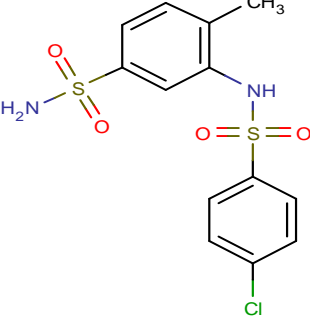
Structure	Masse Moléculaire (g/mol)	log P	Donneur de liaison Hydrogène	Accepteur de liaison Hydrogène	Inhibition moyenne à 100µM (1 = 100% d'inhibition)
	368,38	2,99	0	4	0
	398,836	4,86	0	3	0
	368,38	3,6	0	5	0
	400,852	5,21	0	3	0

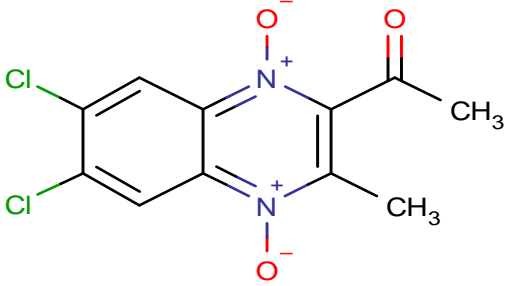
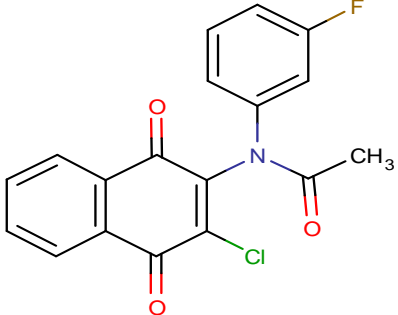
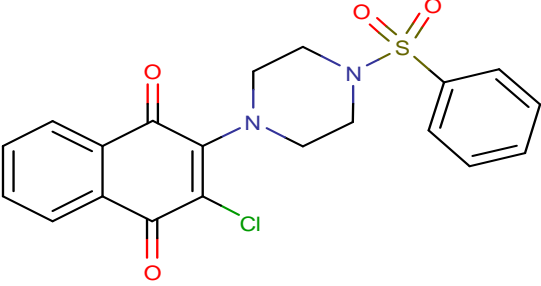
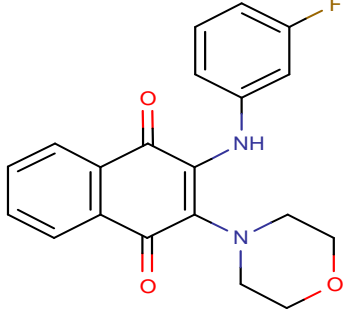
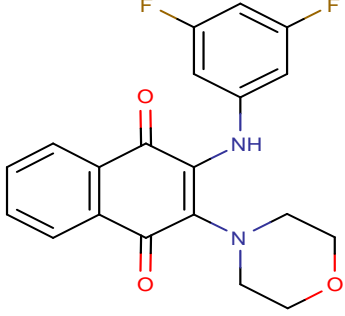
	310,73	2,95	0	3	0
	310,73	3,04	0	3	0
	344,746	3,29	0	3	0
	234,25	-5,11	2	3	0
	232,232	3,49	2	4	0,39

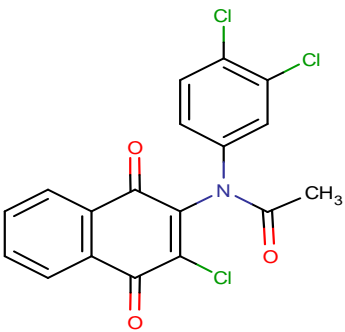
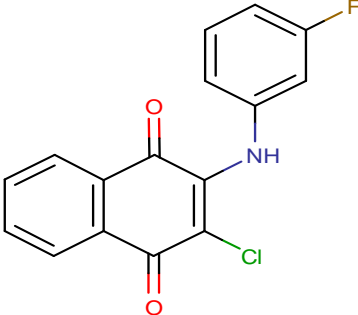
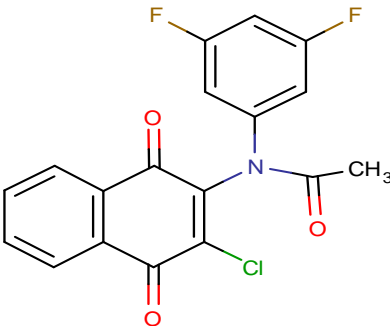
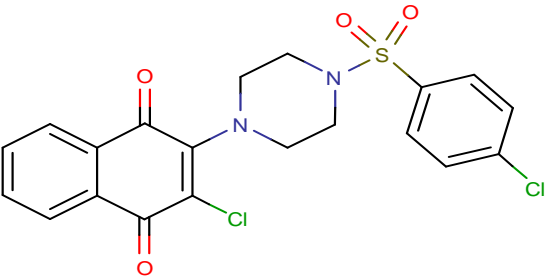
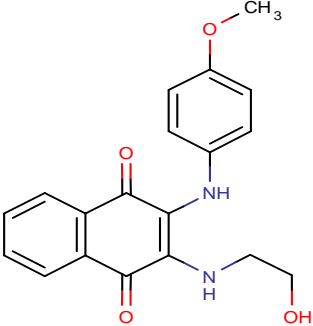
	227,33	2,6	2	5	0,15
	289,369	2,71	2	4	0,13
	134,139	-0,17	1	3	0,07
	188,179	2,24	1	3	0,98
	249,264	2,41	1	3	0,24

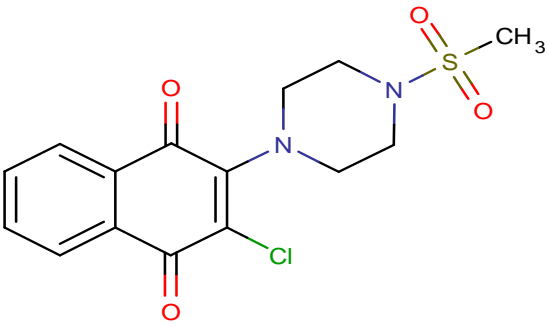
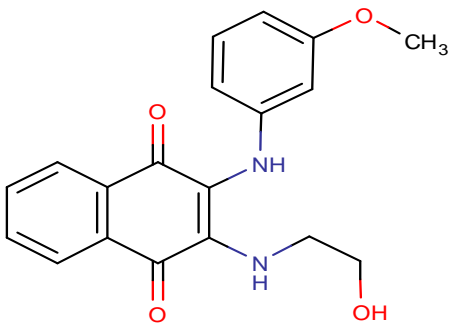
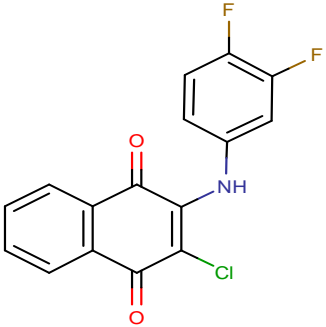
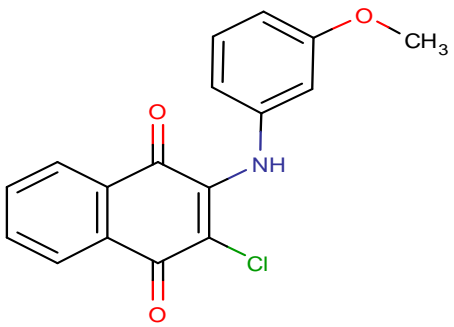
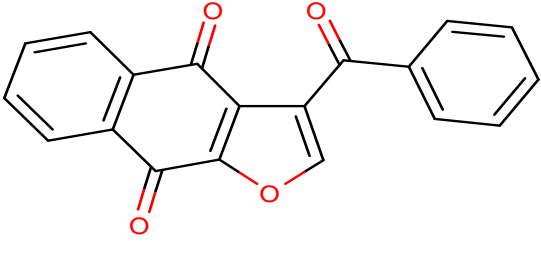
	547,569	3,99	1	6	0,15
	220,269	3,85	0	2	0
	303,311	3,24	0	4	0,29
	299,232	-0,02	0	3	0,45
	254,19	-0,44	0	3	0,01

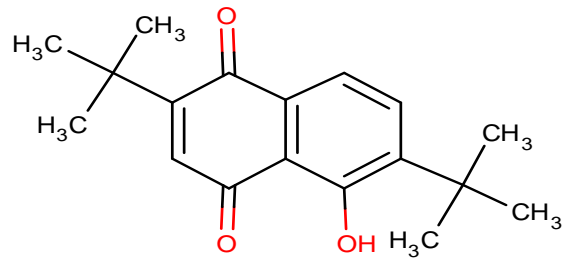
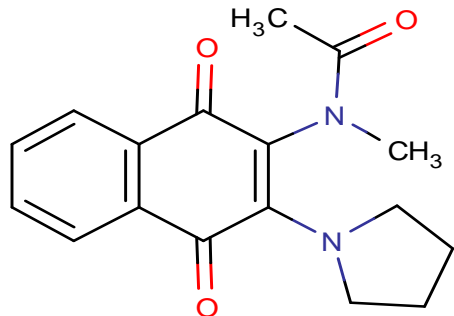
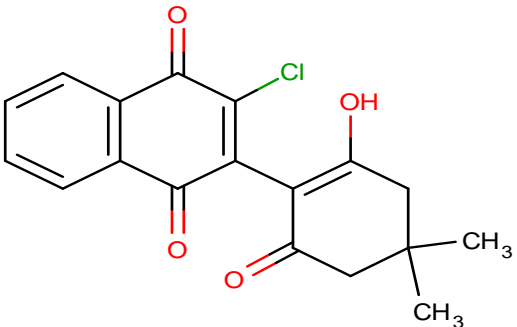
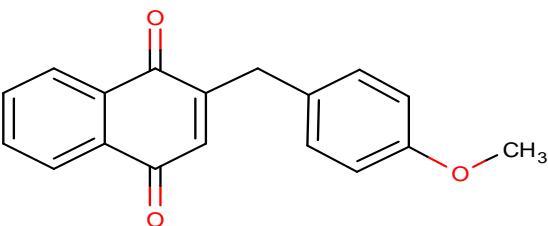
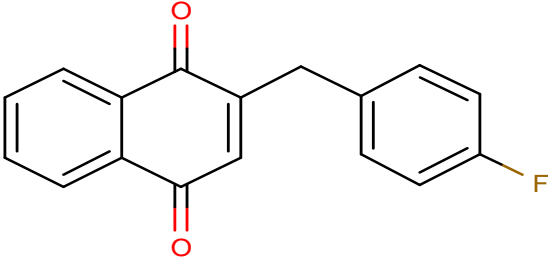
	236,651	3,92	1	2	0
	397,469	1,24	2	5	0
	397,812	3,22	0	6	0,28
	266,096	1,92	0	2	0,52
	451,538	1,9	0	6	0

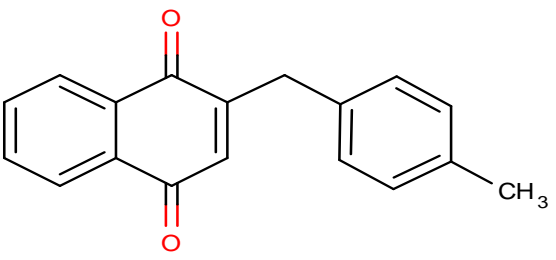
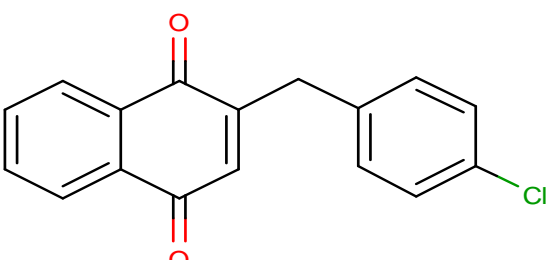
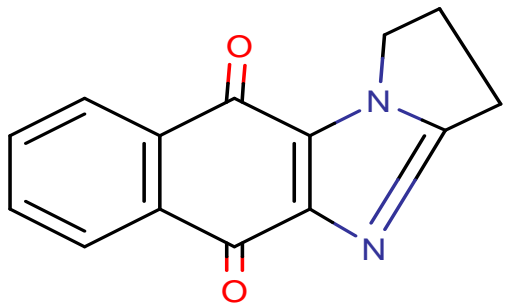
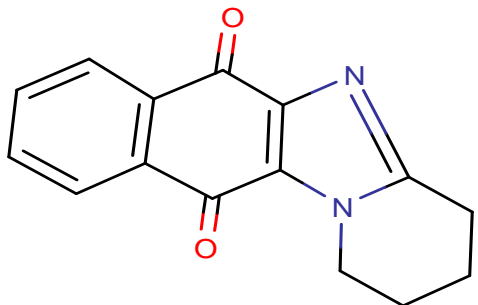
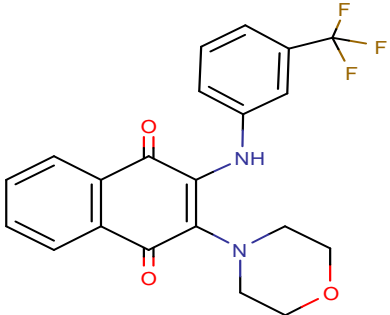
	466,937	3,22	0	5	0
	495,774	3	0	5	0,16
	368,835	0,62	0	5	0,9
	398,815	2,61	0	4	0,81
	360,836	2,18	2	4	0

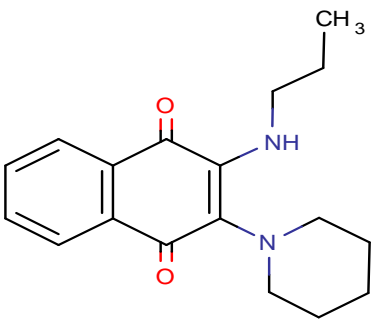
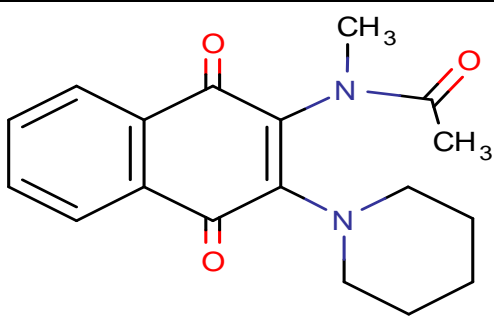
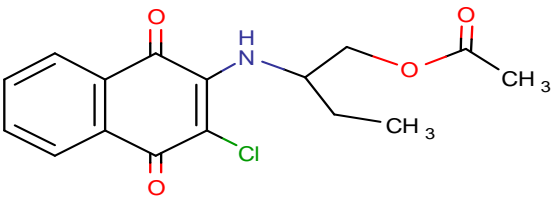
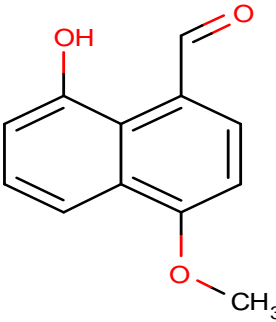
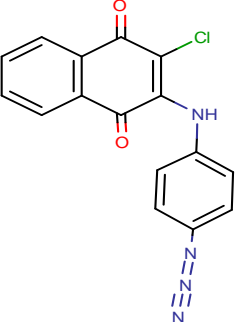
	287,099	0,49	0	3	0
	343,736	2,57	0	3	0,86
	416,878	2,23	0	5	0,58
	352,359	1,99	1	5	0,1
	370,349	2,14	1	5	0,2

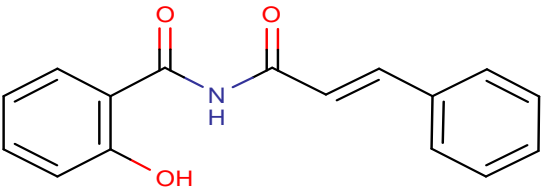
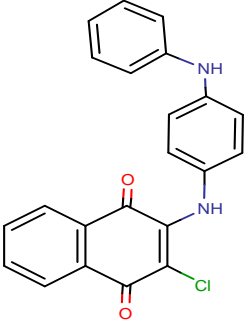
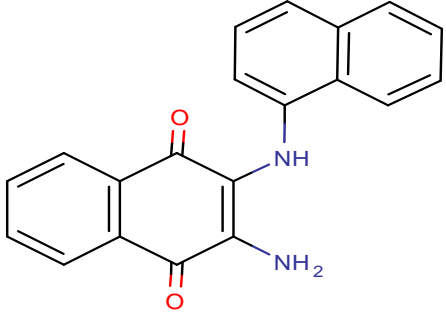
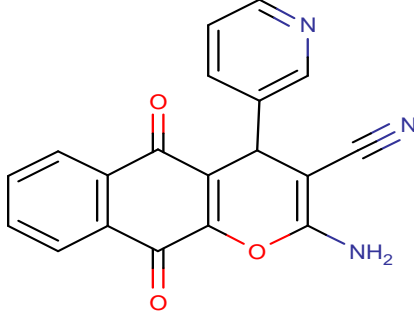
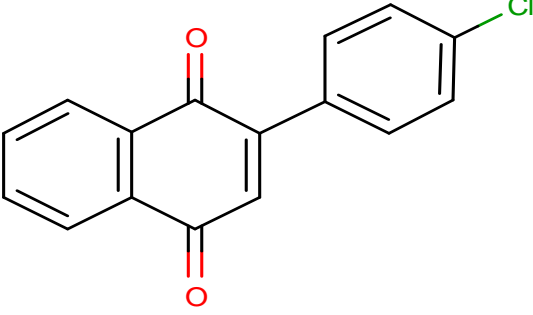
	394,636	3,64	0	3	0,74
	301,7	2,94	1	3	0,5
	361,727	2,71	0	3	0,41
	451,323	2,83	0	5	0,17
	338,357	0,84	3	6	0,17

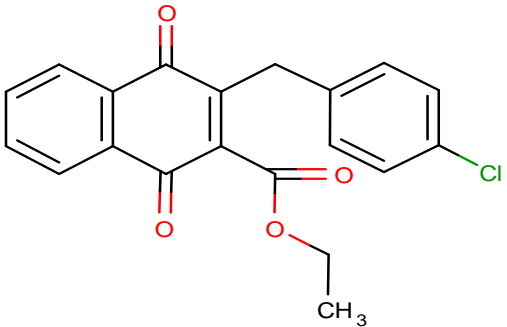
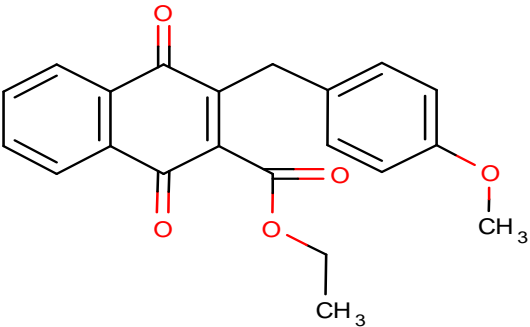
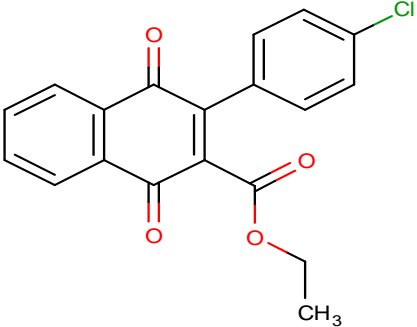
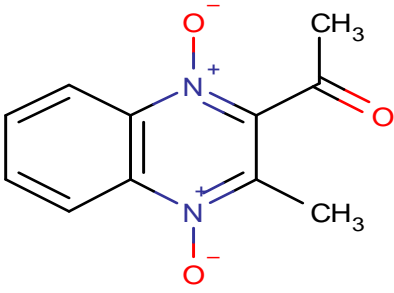
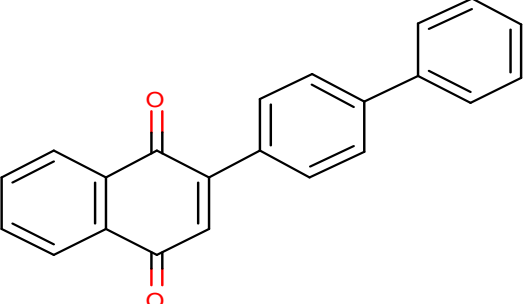
	354,809	0,11	0	5	0,91
	338,357	0,84	3	6	0,16
	319,69	3,08	1	3	0,01
	313,735	2,64	1	4	0,43
	302,28	3,44	0	3	0,44

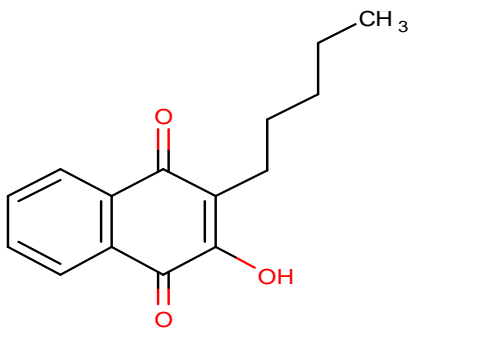
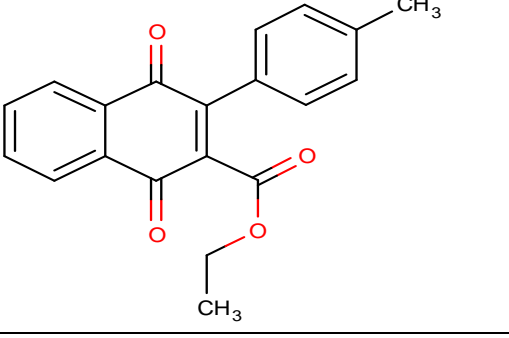
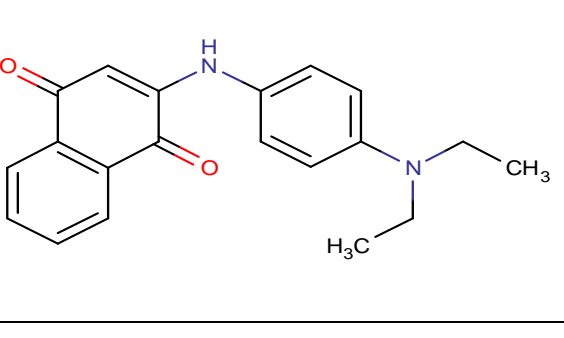
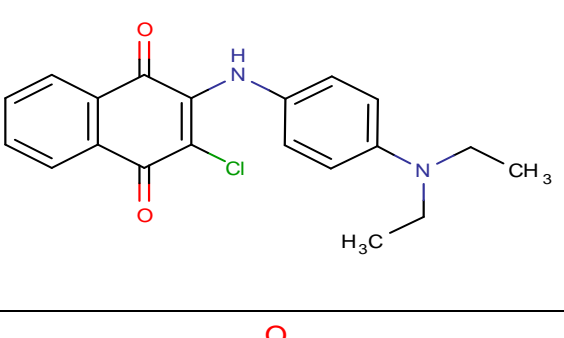
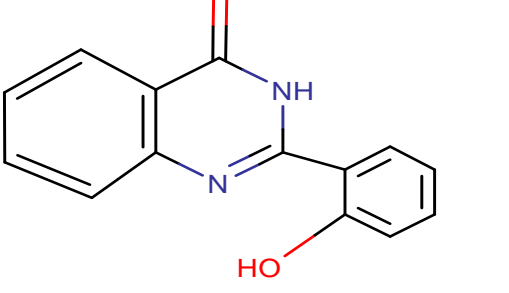
	286,366	4,81	1	3	0,04
	298,336	0,45	0	4	0
	330,762	2,57	1	4	0,54
	278,302	3,31	0	3	0,83
	266,266	3,61	0	2	0,91

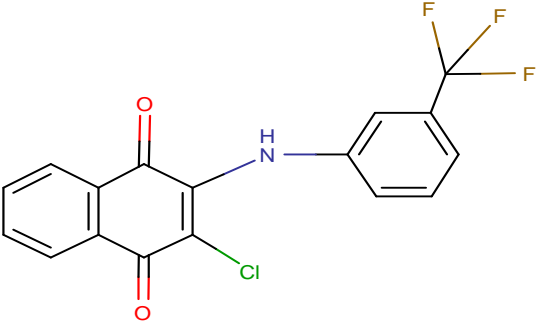
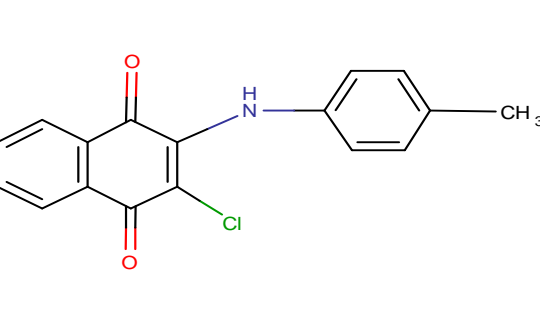
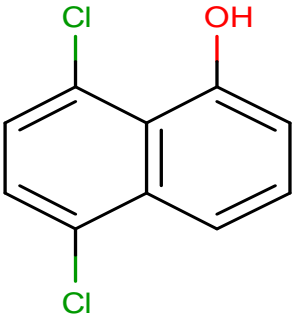
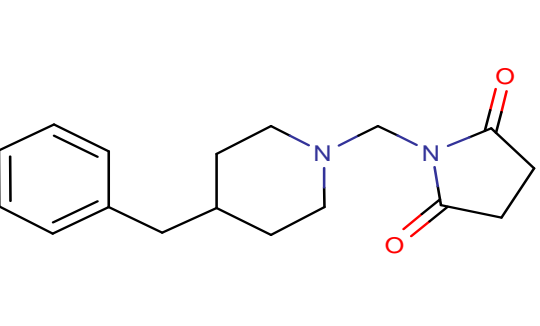
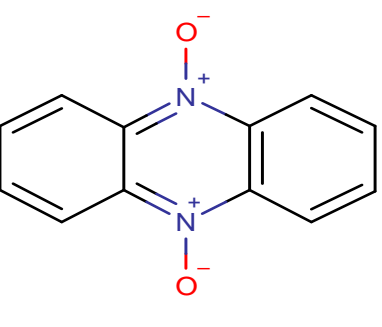
	262,303	3,98	0	2	0,82
	282,721	4,07	0	2	0,54
	238,241	1,68	0	3	0
	252,268	2,12	0	3	0,19
	402,366	2,73	1	5	0,09

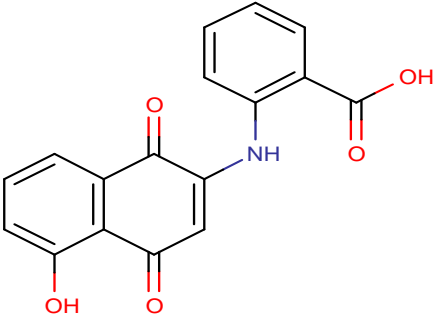
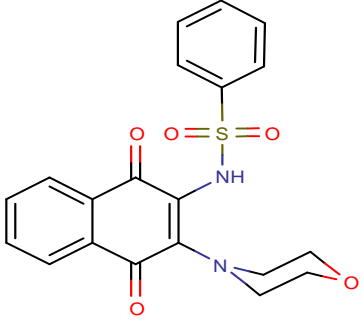
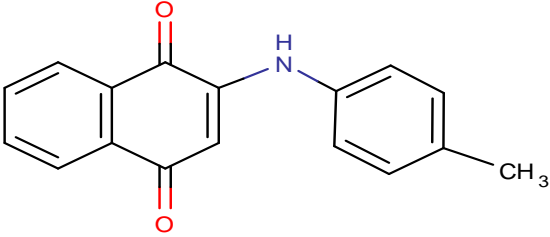
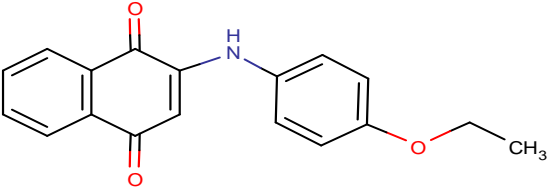
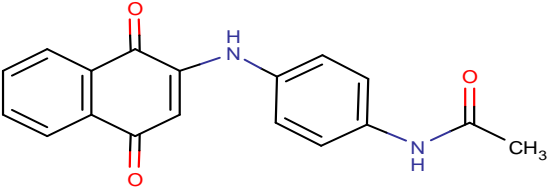
	298,38	2,16	1	4	0,56
	312,363	0,89	0	4	0,09
	321,756	1,85	1	4	0,7
	202,206	2,21	1	3	0
	324,721	2,04	1	6	0,24

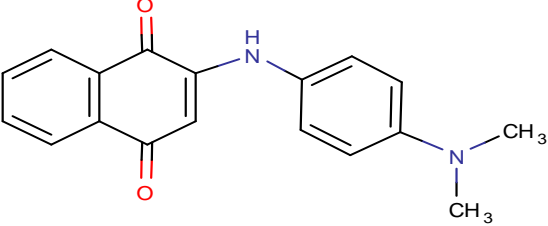
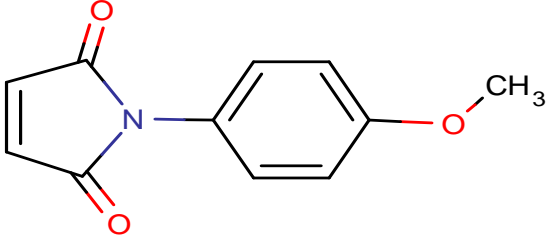
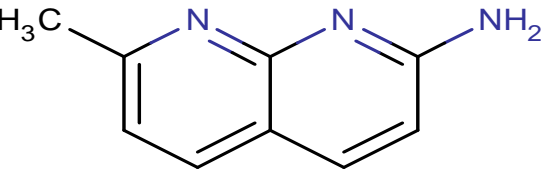
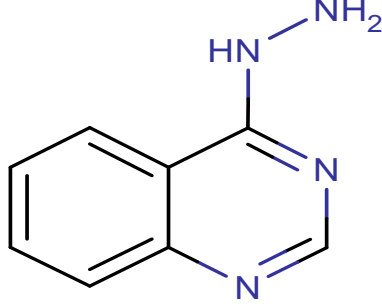
	267,279	3,52	2	3	0
	374,82	4,24	2	4	0,03
	314,337	2,24	2	4	0
	329,309	0,97	1	6	0,59
	268,694	3,77	0	2	0,36

	354,784	4,4	0	3	0,43
	350,365	3,63	0	4	0,59
	340,757	4,09	0	3	0,7
	218,209	-0,72	0	3	0
	310,345	4,81	0	2	0,04

	244,286	3,15	1	3	0,39
	320,339	4	0	3	0,84
	320,385	3,23	1	4	0,17
	354,83	3,62	1	4	0
	238,241	2,32	2	3	0

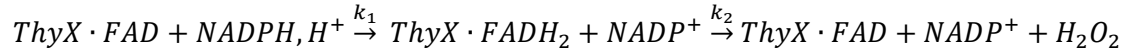
	351,707	3,68	1	3	0
	297,736	3,31	1	3	0
	213,06	3,87	1	1	0,36
	286,369	2,07	0	3	0
	212,204	1,18	0	2	0,63

	309,273	3,06	3	6	0,35
	398,432	1,21	1	6	0,19
	263,291	2,92	1	3	0
	293,317	2,61	1	4	0,17
	306,315	1,65	2	4	0,32

	292,332	2,52	1	4	0,17
	203,194	1,09	0	3	0
	159,188	1,14	1	3	0
	160,176	1,41	2	4	0

9. Annexe 3 : Résolution de l'équation (1) en (3) :

Nous avons :



Simplifiée par soucis de clarté en :



L'absorbance à 450 nm en fonction du temps présentée dans la figure 2-3.A traduit la concentration en FAD. Nous désirons ici exprimer la concentration de totale de FAD en fonction du temps et des constantes FAD_0 , concentration de FAD initiale, et de k_1 et k_2 , constantes de vitesse des deux transferts d'hydrure considérés.

Nous avons un système dans lequel :

$$1) \quad \frac{d(\text{FAD}_A)}{dt} = -k_1 \text{FAD}_A \quad \text{et} \quad \text{FAD}_A = \text{FAD}_0 e^{-k_1 t} \quad (24)$$

$$2) \quad \frac{d(\text{FADH}_2)}{dt} = k_1 \text{FAD}_A - k_2 \text{FADH}_2 \quad (26)$$

Nous savons que : $\text{FAD} = \text{FAD}_0 - \text{FADH}_2$. Nous allons donc déterminer l'expression de la concentration en FADH_2 en fonction du temps (i), et nous en déduirons l'expression de la concentration de FAD en fonction du temps

(ii).

i) Determination de la concentration de FADH₂ en fonction du temps :

En remplaçant l'expression de FAD_A (24) dans l'équation (25), nous obtenons :

$$\frac{d(FADH_2)}{dt} = k_1 FAD_0 e^{-k_1 t} - k_2 FADH_2 \quad (27)$$

$$\frac{d(FADH_2)}{dt} + k_2 FADH_2 = k_1 FAD_0 e^{-k_1 t} \quad (28)$$

$$\frac{d(FADH_2) * e^{k_2 t}}{dt} + k_2 FADH_2 * e^{k_2 t} = k_1 FAD_0 e^{(k_2 - k_1)t} \quad (29)$$

$$\frac{d(FADH_2 * e^{k_2 t})}{dt} = k_1 FAD_0 e^{(k_2 - k_1)t} \quad (30)$$

$$d(FADH_2 * e^{k_2 t}) = k_1 FAD_0 e^{(k_2 - k_1)t} dt \quad (31)$$

$$\int d(FADH_2 * e^{k_2 t}) = \int k_1 FAD_0 e^{(k_2 - k_1)t} dt \quad (32)$$

$$FADH_2 * e^{k_2 t} = \frac{k_1 FAD_0}{k_2 - k_1} e^{(k_2 - k_1)t} + c \quad (33)$$

où c est la constante qui découle de l'intégrale. A $t=0$, $[FADH_2] = 0$, et on a donc :

$$c = -\frac{k_1 FAD_0}{k_2 - k_1} \quad (34)$$

D'où :

$$FADH_2 * e^{k_2 t} = \frac{k_1 FAD_0}{k_2 - k_1} e^{(k_2 - k_1)t} - \frac{k_1 FAD_0}{k_2 - k_1} \quad (35)$$

$$FADH_2 = \frac{k_1 FAD_0}{k_2 - k_1} e^{-k_1 t} - \frac{k_1 FAD_0}{k_2 - k_1} e^{-k_2 t} \quad (36)$$

$$FADH_2 = \frac{k_1 FAD_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (37)$$

ii) Determination de la concentration en FAD en fonction du temps :

$$FAD = FAD_0 - FADH_2 \quad (39)$$

Où « FAD » est la concentration totale de FAD à l'instant t. En remplaçant

FADH₂ par son équivalent dans l'équation (37), nous obtenons :

$$FAD = FAD_0 - \frac{k_1 FAD_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (40)$$

$$FAD = FAD_0 \left[1 - \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \right] \quad (3)$$

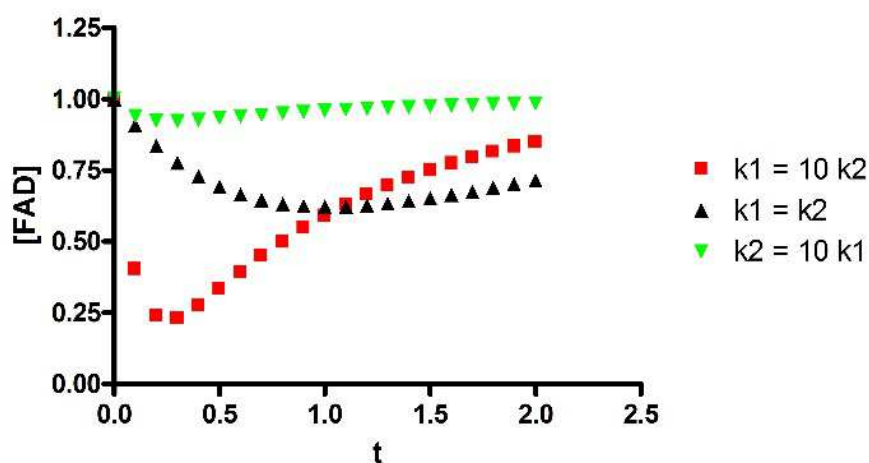
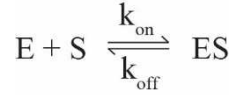


Figure 9-1 : Simulation de la concentration en FAD en fonction du temps pour différentes valeurs relatives de k_1 et k_2 .

Une simulation de la cinétique décrite par l'équation (3) est montrée en figure 9-1, et l'allure de la courbe en rouge correspond aux résultats expérimentaux présentés dans la figure 2-3.A pour lesquels la vitesse de réduction du FAD (40 s^{-1}) est supérieure à la vitesse de ré-oxydation du FADH_2 par O_2 ($1,5 \text{ s}^{-1}$).

10. Annexe 4 : Resolution de l'équation (5) en (6)

Nous étudions la formation du complexe ThyX·FAD·dUMP selon le schéma simplifié suivant :



où E, S et ES représentent ThyX·FAD, dUMP et le complexe ThyX·FAD·dUMP respectivement. La formation du complexe ThyX·FAD·dUMP se traduit par une augmentation de l'absorbance à 505 nm, présenté dans la figure 3-5.B. Nous désirons donc ici résoudre l'expression de ThyX·FAD·dUMP en fonction du temps et de k_{on} et k_{off} , les constantes de vitesse de formation et dissociation du complexe.

D'après le schéma ci-dessus, nous pouvons poser :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{on} \cdot [E] \cdot [S] - k_{off}[ES] \quad (41)$$

(5)

Nous supposons que $[E] \ll [S]$ et que $[S]_t = [S]_0$, la concentration en substrat au temps zéro. D'après la loi de conservation de masse, on sait que $[E]_0 = [E] + [ES]$ où $[E]_0$ est la concentration de ThyX·FAD à l'instant $t = 0$. En remplaçant $[E]$ par $([E]_0 - [ES])$, nous obtenons :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{on} \cdot ([E]_0 - [ES]) \cdot [S] - k_{off}[ES] \quad (42)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S] - k_{on} \cdot [ES] \cdot [S] - k_{off}[ES] \quad (43)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S] - (k_{on} \cdot [S] + k_{off})[ES] \quad (44)$$

On pose :

$$K_{obs} = k_{on} \cdot [S] + k_{off} \quad (7)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S] - K_{obs}[ES] \quad (42)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} + K_{obs}[ES] = k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S] \quad (43)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} \cdot e^{K_{obs}t} + K_{obs}[ES] \cdot e^{K_{obs}t} = k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S] \cdot e^{K_{obs}t} \quad (44)$$

$$\frac{d([ES] \cdot e^{K_{obs}t})}{dt} = k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S] \cdot e^{K_{obs}t} \quad (45)$$

$$\int d([ES] \cdot e^{K_{obs}t}) = \int k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S] \cdot e^{K_{obs}t} \cdot dt \quad (46)$$

Et donc :

$$[ES] \cdot e^{K_{obs}t} = \frac{k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_{obs}} \cdot e^{K_{obs}t} + c \quad (47)$$

où c est la constante qui découle de l'intégrale. A t = 0, [ES] = 0, et nous pouvons donc déterminer c :

$$c = -\frac{k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_{obs}} \quad (48)$$

$$[ES] \cdot e^{K_{obs}t} = \frac{k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_{obs}} \cdot e^{K_{obs}t} - \frac{k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_{obs}} \quad (49)$$

$$[ES] = \frac{k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_{obs}} - \frac{k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_{obs}} \cdot e^{-K_{obs}t} \quad (50)$$

$$[ES] = \frac{k_{on} \cdot [E]_0 \cdot [S]}{K_{obs}} (1 - e^{-K_{obs}t}) \quad (6)$$

Cette équation est l'équation (6) présentée dans le chapitre III (p.91) et décrit effectivement une fonction exponentielle croissante.

Les cinétiques de fixation du dUMP présentées dans la figure 3-5.B ont été ajustées à l'équation générique d'une exponentielle croissante (équation (8)). A titre de contrôle, les constantes cinétiques déterminées de cette manière (k_{on} , k_{off})

ont été utilisées afin de simuler la concentration de complexe [ES] en fonction du temps d'après l'équation (6) :

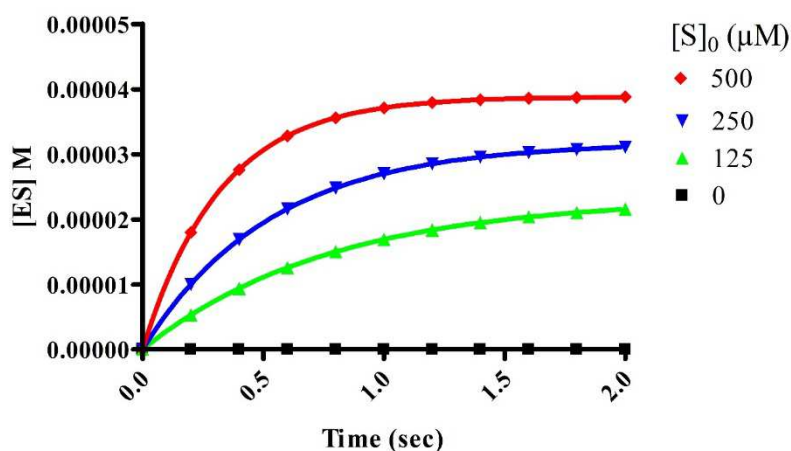


Figure 10-1 : Simulation de la concentration du complexe [ES] en fonction du temps décrite par l'équation (6). Les constantes utilisées sont celles déterminées avec les résultats expérimentaux (Chapitre III, page 91-92) : $k_{on} = 4820 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_{off} = 0.69 \text{ s}^{-1}$, et $[E]_0 = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, pour différentes concentrations de dUMP.

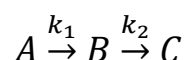
La simulation présentée dans la figure 10-1 correspond effectivement aux résultats expérimentaux présentés dans la figure 3-5.B, et valide à la fois le modèle cinétique ainsi que l'ajustement des cinétiques de fixation du dUMP sur ThyX·FAD à l'équation (8).

11. Annexe 5 : Résolution des équations (10) et (11) :

Nous avons :



Que l'on simplifie pour l'écriture en :



A 505 nm, les formes A, B et C de la flavine (FAD, FAD·dUMP et FADH₂ respectivement) absorbent avec des coefficients d'extinction molaires différents. Ainsi, la cinétique mesurée à 505 nm (présentée dans la figure 3-7.B) représente la somme des cinétiques de A, B et C, pondérés par leur coefficient d'extinction molaire respectif à cette longueur d'onde :

$$Abs_{505\text{ nm}} = (A\varepsilon_1 + B\varepsilon_2 + C\varepsilon_3)l \quad (63)$$

Où l est le trajet optique (0.08 cm) et les ε_1 , ε_2 et ε_3 sont les coefficients d'extinction molaires de FAD, FAD·dUMP et de FADH₂ à 505 nm respectivement.

Afin de décrire la cinétique présentée dans la figure 3-7.B, nous résoudrons séparément les expressions de A, B et C en fonction du temps. Par la suite, nous effectuerons la somme de ces trois cinétiques en prenant en compte les coefficients d'extinction molaires de chaque espèce. Enfin, nous effectuerons

une simulation des equations finales obtenues et les comparerons aux résultats expérimentaux afin de verifier la validité du modèle cinétique proposé.

D'après le schéma simplifié ci-dessus, nous pouvons écrire :

$$1) \quad \frac{dA}{dt} = -k_1A \quad \text{et} \quad A = A_0 e^{-k_1 t} \quad (10)$$

$$2) \quad \frac{dB}{dt} = k_1A - k_2B \quad (51)$$

$$3) \quad C = A_0 - A - B \quad (52)$$

En remplaçant A dans l'équation (51) par son equivalent dans l'équation (10), nous obtenons :

$$\frac{dB}{dt} = k_1A_0 e^{-k_1 t} - k_2B \quad (53)$$

$$\frac{dB}{dt} + k_2B = k_1A_0 e^{-k_1 t} \quad (54)$$

$$\frac{dB}{dt} e^{k_2 t} + k_2 B e^{k_2 t} = k_1 A_0 e^{-k_1 t} e^{k_2 t} \quad (55)$$

$$\frac{d(Be^{k_2 t})}{dt} = k_1 A_0 e^{(k_2 - k_1)t} \quad (56)$$

$$d(Be^{k_2 t}) = k_1 A_0 e^{(k_2 - k_1)t} dt \quad (57)$$

$$\int d(Be^{k_2 t}) = \int k_1 A_0 e^{(k_2 - k_1)t} dt \quad (58)$$

$$(Be^{k_2 t}) = \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} e^{(k_2 - k_1)t} + X \quad (59)$$

Où X est la constante issue de l'intégrale. A t=0, B=0, donc :

$$X = -\frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} \quad (60)$$

D'où :

$$B e^{k_2 t} = \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} e^{(k_2 - k_1)t} - \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} \quad (61)$$

$$B = \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (11)$$

Enfin :

$$C = A_0 - A - B \quad (62)$$

$$C = A_0 - A_0 e^{-k_1 t} - \frac{k_1 A_0}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (12)$$

Disposant des équations de A, B et C en fonction du temps, nous pouvons en déduire l'expression de l'Abs_{505nm} en fonction du temps en posant :

$$\varepsilon_1 = \varepsilon_{FAD}, \quad \varepsilon_2 = n * \varepsilon_1 \quad \text{et} \quad \varepsilon_3 = m * \varepsilon_1$$

De cette manière, une simplification de l'équation () nous permet d'écrire :

$$Abs_{505nm} = A_0 * \varepsilon_{FAD,505nm} * l \left[\left(1 + \frac{(n-m)k_1}{k_2 - k_1} - m \right) e^{-k_1 t} + \left(\frac{(m-n)k_1}{k_2 - k_1} \right) e^{-k_2 t} + m \right] \quad (13)$$

qui décrit bien la somme de deux exponentielles. Une simulation des courbes décrites par les équations de A, B, C et Abs_{505nm} en fonction du temps est présentée en figure 10-1.

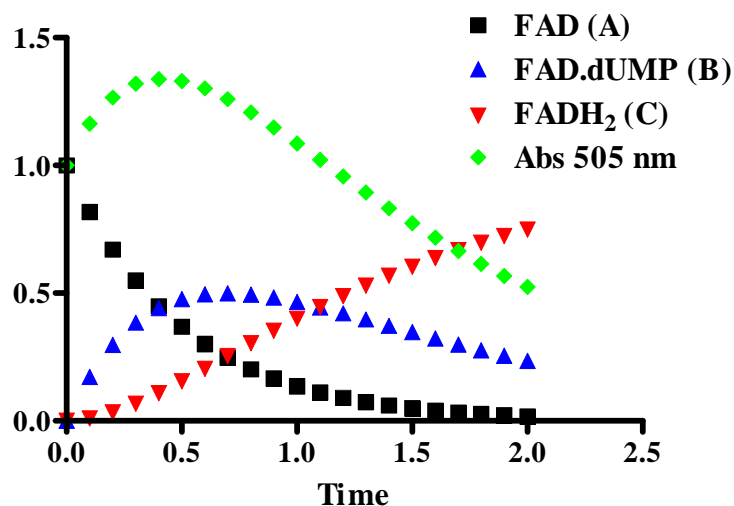


Figure 11-1 Simulation des concentrations relatives de A, B et C et de la cinétique d'absorbance à 505 nm qui en résulte, en fonction du temps. $k_1 = 2$, $k_2 = 1$, $n = 2$ et $m = 0,05$. Les constantes de vitesse utilisées sont arbitraires. n et m ont été sélectionnées qualitativement en fonction des absorbances relatives des différentes espèces étudiées observées à 505 nm.

La simulation de la concentration des différentes espèces A, B et C correspond bien aux résultats attendus pour deux réactions consécutives. De plus, l'allure de la courbe de l'absorbance à 505 nm simulée concorde avec les données expérimentales présentées en figure 3-7.B. Les cinétiques de la figure 3-7.B ont été ajustées à l'équation (13), équation générique de la somme de deux exponentielles fournies par le logiciel BioKine et utilisée pour l'analyse des données de stopped-flow. Par conséquent, cette démonstration valide bien le modèle cinétique considéré et l'analyse par ajustement à l'équation (13).