ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1

UNITÉS DE FORMATION ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES

THESE
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1

N° de Discipline : 50
École Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement

par

Audrey TUPIN
le 19 novembre 2010

Titre:

INHIBITEURS DE LA TRANSCRIPTION BACTÉRIENNE: ÉTUDE DU MÉCANISME D'ACTION DE LA LIPIARMYCINE ET DÉPENDANCE AU FACTEUR DE TRANSCRIPTION σ

JURY

Pr Estelle JUMAS-BILAK, Professeur des Universités, Montpellier	Président
Dr Bianca SCLAVI, Chargée de Recherche CNRS, Cachan	Rapporteur
Dr Françoise NOREL-BOZOUKLIAN, Chargée de Recherche, Institut Pasteur, Paris	Rapporteur
Dr Yegor VASSETZKY, Directeur de Recherche, CNRS, Villejuif	Examinateur
Dr Rachid RAHMOUNI, Directeur de Recherche, CNRS, Orléans	Examinateur
Dr Stephan KÖHLER, Directeur de Recherche, INSERM, Montpellier	Examinateur
Dr Jean-Paul LEONETTI, Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier	Directeur de Thèse
Dr Konstantin BRODOLIN, Chargé de Recherche, INSERM, Montpellier	Co-directeur de Thèse

ACADEMIE DE MONTPELLIER
UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1

UNITÉS DE FORMATION ET DE RECHERCHE PHARMACEUTIQUES

THESE
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER 1

N° de Discipline : 50
École Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

présentée et soutenue publiquement

par

Audrey TUPIN
le 19 novembre 2010

Titre:

INHIBITEURS DE LA TRANSCRIPTION BACTÉRIENNE: ÉTUDE DU MÉCANISME D'ACTION DE LA LIPIARMYCINE ET DÉPENDANCE AU FACTEUR DE TRANSCRIPTION σ

JURY

Pr Estelle JUMAS-BILAK, Professeur des Universités, Montpellier	Président
Dr Bianca SCLAVI, Chargée de Recherche CNRS, Cachan	Rapporteur
Dr Françoise NOREL-BOZOUKLIAN, Chargée de Recherche, Institut Pasteur, Paris	Rapporteur
Dr Yegor VASSETZKY, Directeur de Recherche, CNRS, Villejuif	Examinateur
Dr Rachid RAHMOUNI, Directeur de Recherche, CNRS, Orléans	Examinateur
Dr Stephan KÖHLER, Directeur de Recherche, INSERM, Montpellier	Examinateur
Dr Jean-Paul LEONETTI, Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier	Directeur de Thèse
Dr Konstantin BRODOLIN, Chargé de Recherche, INSERM, Montpellier	Co-directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Dr. Konstantin Brodolin et Dr. Jean-Paul Leonetti pour avoir assuré la direction scientifique de cette thèse. Au delà de leurs compétences scientifiques, je les remercie pour leur disponibilité et leur soutien tout au long de mon travail.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci donc au Pr. Estelle Jumas-Bilak d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse ainsi qu'au Dr. Bianca Sclavi et au Dr. Françoise Norel-Bozouklian pour avoir été rapporteurs de ce manuscrit. Merci également aux Dr. Yegor Vassetzky, Dr. Rachid Rahmouni et au Dr. Stephan Köhler pour avoir examiné mon mémoire et pour leur rôle au sein du jury.

Ce travail de thèse s'est déroulé au sein du CPBS dont je remercie le personnel notamment la cellule support: Nathalie Pasqualini, Sandrine Peired et Géraldine Cubero pour avoir faciliter toutes les démarches administratives. J'ai une pensée toute particulière pour l'équipe « Transcription et résistance aux antibiotique » qui m'a accompagnée pendant ces trois années. Merci donc à Françoise Roquet-Banères et Martine Pugnière pour leur bonne humeur qui a permis une bonne cohabitation dans le bureau. Merci également à Zakia Morichaud, Maxime Gualtieri, Philippe Villain-Guillot, Siham Jihani, Yangbo Hu, Pascale Bouhours et les stagiaires qui ont travaillé au sein du laboratoire. Je tiens également à remercier la société Deinove avec laquelle nous avons partagé les locaux pendant un temps (trop court). Merci tout d'abord à Stéphanie Texier, Laure Gaufres, Pascale Joseph et Cathy Isop, puis à Guillaume Marcellin, Patrick Hivin et bien sûr à Lucie Roux et Esther Gerber pour leur bonne humeur, les fous rires, etc.

Je voudrais aussi remercier les professeurs et les équipes qui m'ont formés au long de mon parcours universitaire, en particulier Olivier Thaler, Jean-Michel Escoubas, Pascale Joseph, Stephan Köhler, David Fenard et Laurence Briant.

Enfin, je voudrais exprimer ma reconnaissance à mes parents qui m'ont toujours permis de mener mes études dans de bonnes conditions.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS....3
TABLE DES MATIERES....4
TABLE DES ABREVIATIONS....8
AVANT-PROPOS….....9

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION....13
A. L'utilisation de l'ARN polymérase comme cible des antibiotiques et le problème des résistances bactériennes....14
A.I) Situation actuelle....14
A.II) Les causes de la résistance bactérienne : les facteurs liés aux bactéries....15
A.II)1. La résistance intrinsèque....15
A.II)2. La résistance acquise....15
A.II)2.1) Les mutations....16
A.II)2.2. Les transferts....16
A.II)3. Le phénomène de persistance....16
A.II)4. La formation de biofilms....18
A.III) Les sources des nouveaux antibiotiques....20
A.III)1. Les antibiotiques naturels....20
A.III)2. Les antibiotiques synthétiques....20
A.IV) Pourquoi est-il important de comprendre le mécanisme d'action des antibiotiques ?....21
A.V) L'ARN polymérase comme cible de ces antibiotiques....21
B. L' ARN polymérase....24
B.I) Le core de l'ARN polymérase....24
B.I)1. Les différentes sous-unités formant le core....24
B.I)1.1) La sous-unité α....25
B.I)1.2) La sous-unité β....27
B.I)1.3) La sous-unité β'....28
B.I)1.4) La sous-unité ω....28
B.I)2. Le core de l'ARN polymérase a une structure en « pince de crabe »....28

B.I)2.1) Structure globale du core....28
B.I)2.2) Les domaines mobiles....29
B.I)3. Les différents domaines fonctionnels du core....30
B.I)3.1) Le domaine β' « bridge helix »....30
B.I)3.2) Le domaine β' « trigger loop »....31
B.I)3.3) Le domaine β' « jaw »....32
B.I)3.4) Le domaine β' « clamp »....32
B.I)3.5) Les régions « switch »....33
B.I)3.6) Le domaine β' « rudder »....34
B.I)3.7) Le domaine β' « lid »....35
B.I)3.8) Le domaine « zipper »....35
B.I)3.9) Le domaine β « flap »....36
B.I)4. Les différents canaux formés par les domaines du core....37
B.I)4.1) Le canal principal ou canal du site actif....37
B.I)4.2) Le canal secondaire....39
B.I)4.3) Le canal de sortie de l'ARN....39
B.II) L'holoenzyme....40
B.II)1. Les fonctions du facteur σ....40
B.II)2. Les différentes familles de facteur σ....41
B.II)3. La régulation de la transcription et les différents facteurs σ....43
B.II)4. La structure de σ^{70}....44
B.II)4.1) Le domaine σ_1....45
B.II)4.2) Le domaine σ_2....46
B.II)4.3) Le domaine σ_3....48
B.II)4.4) Le domaine σ_4....49
B.II)5. La liaison de la sous-unité σ au core : formation de l'holoenzyme....50
C. Les étapes du cycle transcriptionnel....52
C.I) L'initiation....52
C.I)1. La formation du complexe fermé....52
C.I)2. Les différents types d'éléments de promoteurs reconnus par les facteurs σ....53
C.I)3. Les étapes intermédiaires....56
C.I)3.1) Le passage de RPc à RPi....56
C.I)3.2) Isomérisation du promoteur....56

C.I)3.3) Ouverture du promoteur.....57
C.I)3.4) Entrée de l'ADN dans le canal principal.....57
C.I)4. La formation du complexe ouvert.....58
C.I)4. L'initiation abortive.....59
C.I)6. La transition entre l'initiation abortive et l'élongation.....60
C.II) L'élongation.....61
C.II)1. La structure du complexe d'élongation.....61
C.II)2. La progression de l'ADN et de l'ARN dans le TEC au cours de la transcription.....62
C.II)3. Le cycle d'addition des nucléotides.....63
C.II)4. Le maintient de la fidélité de la transcription.....64
C.III) La terminaison.....64
C.III)1. La terminaison indépendante du facteur Rho.....64
C.III)2. La terminaison dépendante du facteur Rho.....65
C.IV) Rôle du couple DksA/(p)ppGpp dans la régulation de la transcription.....66
C.IV)1. DksA.....66
C.IV)2. (p)ppGpp.....67
C.IV)3. Effet synergique de DksA et de (p)ppGpp.....69
D. Les inhibiteurs de l'ARN polymérase.....70
D.I) Les molécules ciblant le canal principal de l'ARN polymérase.....70
D.I)1. Les ansamycines.....71
D.I)2. La streptolydigine.....73
D.I)3. Les sorangicines.....74
D.I)4. La série CBR703.....75
D.I)5. La myxopyronine.....76
D.I)6. Les corallopyronines.....77
D.I)7. Les ripostatines.....78
D.II) Les molécules ciblant le canal de sortie de l'ARN.....79
D.II)1. La lipiarmycine.....79
D.III) Les molécules ciblant le canal secondaire de l'ARN polymérase.....81
D.III)1. La microcine J25.....81
D.III)2. La tagetitoxine.....82
D.IV) Les inhibiteurs ciblant d'autres éléments de l'ARNP ou dont le site de liaison n'a pas été déterminé.....83

D.IV)1. Le peptide GE23077....83
D.IV)2. Les pyrrothines....84
D.IV)3. L' ureidothiophene....84
D.IV)4. Le groupe SB....85
D.IV)5. La zwittermicine A....85
D.IV) Articles n°1 et n°2....87

CHAPITRE 2 : RÉSULTATS....101
A. Introduction....102
B. Résultats....103
B.I) Détermination du site de liaison de la lipiarmycine....103
B.II) Détermination du mécanisme d'action de la lipiarmycine....107
B.II)1. La lipiarmycine agit avant la première étape catalytique....108
B.II)2. Rôle de l'élément « switch-2 »....109
B.II)3. Effet de la lipiarmycine sur la fusion de l'ADN....110
B.II)4. Rôle de la région 3.2 de σ et interactions avec l'élément « switch-2 »....113
C. Conclusion....116
D. Perspectives....116
E. Articles n°3 et n°4....118

CHAPITRE 3: DISCUSSION....165

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES....171

TABLE DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

ARNP: ARN polymérase

CMI: Concentration minima inhibitrice

Da: Dalton

dNTP: desoxynucléoside triphosphate

FDA: Food and Drug Administration

gp: glycoprotéine

IC_{50}: Inhibitory concentration 50: concentration pour laquelle la croissance de 50% des bactéries est inhibée

kDa : Kilo dalton

Lpm^R: Résistant à la lipiarmycine

Lpm^S: Sensible à la lipiarmycine

N: n'importe lequel des nucléoside (A, G, C, T)

NMP: Nucléoside monophosphate

nt: Nucléotide

NTP : Nucléoside triphosphate

P: Promoteur (cycle transcriptionnel)

pb: paire de bases

PPi: pyrophosphate

ppGpp: guanosine tetraphosphate

pppGpp: guanosine pentaphosphate

R: ARN polymérase (cycle transcriptionnel)

Rif^R: résistant à la rifampicine

RPc: complexe fermé

RPi: complexe intermédiaire

RPo: complexe ouvert

Sor^R: résistant à la sorangicine

TA: toxine-antitoxine

TEC: Transcription elongation complex: complexe d'élongation de transcription

AVANT-PROPOS

Ce document présente les travaux réalisés au cours de ma thèse, effectuée sous la direction de Konstantin BRODOLIN et de Jean-Paul LEONETTI au sein du Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CNRS–UMR5236). L'équipe « Transcription et résistance aux antibiotiques » qui m'a accueillie développe trois axes de recherche.

- La recherche et la caractérisation de nouveaux inhibiteurs de la transcription procaryote.
- La compréhension de la sélectivité de certains inhibiteurs de la transcription sur les gènes des phases exponentielles et stationnaires.
- L'évaluation des effets des mutations conférant des résistances à ces inhibiteurs.

Ces trois axes s'inscrivent dans la recherche de nouveaux agents antibactériens destinés à répondre aux problèmes liés à la montée croissante du phénomène de résistance bactérienne. L'équipe se concentre sur des inhibiteurs ciblant l'ARN polymérase procaryote qui est l'enzyme centrale de la transcription chez les bactéries. Cette enzyme est la cible de la rifampicine, un des antibiotiques les plus efficaces à ce jour. Mais, l'apparition de plus en plus fréquente de bactéries résistantes à cet antibiotique limite sérieusement son utilisation. Les différents mécanismes conduisant à la résistance à la rifampicine sont développés dans la revue :

Tupin A., Gualtieri M., Roquet-Banères F., Morichaud Z., Brodolin K., Leonetti JP. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2010** Jun;35(6):519-23.

La majorité des inhibiteurs de l'ARN polymérase se lient dans une région plus ou moins proche du site de liaison de la rifampicine, ce qui favorise l'apparition de résistances croisées.

La myxopyronine et la lipiarmycine sont les deux seules molécules connues à ce jour dont le site de liaison identifié est localisé en dehors de l'espace commun aux autres inhibiteurs. Mais, elles ne sont pas utilisées en clinique. Le site de liaison et le mécanisme d'action de la myxopyronine ont été décrits en 2008 dans deux articles qui diffèrent dans leur interprétation. Les différents mécanismes d'action proposés dans ces articles sont résumés dans le commentaire d'article :

Tupin A., Gualtieri M., Brodolin K., Leonetti JP. Myxopyronin: a punch in the jaws of bacterial RNA polymerase. *Future Microbiol*. **2009** Mar;4(2):145-9.

Détermination du mécanisme d'action de la lipiarmycine.

Parmi les molécules découvertes au cours des dernières décennies et dont le mécanisme d'action n'est pas encore élucidé nous avons choisi de nous intéresser en particulier à la lipiarmycine pour les diverses raisons exposées dans la suite de ce manuscrit. Cette étude permet de

faire le lien entre les trois axes de recherche développés au sein de l'équipe. Dans un premier temps elle a permis de :

- Préciser le site de liaison de la lipiarmycine.

Afin de déterminer le mécanisme d'action d'une molécule, une des premières étapes consiste à définir son site de liaison au niveau des différents domaines de l'ARN polymérase. Chacun de ces domaines ayant une fonction particulière à une étape du cycle transcriptionnel donné et une localisation précise par rapport à l'ADN et au brin d'ARN en formation, sa détermination donne des indications quant au mécanisme putatif de la molécule. Cette étude a été réalisée grâce à l'analyse de mutants spontanés résistants à une forte concentration de lipiarmycine et est présentée dans l'article :

Gualtieri M., Tupin A., Brodolin K., Leonetti JP. Frequency and characterisation of spontaneous lipiarmycin-resistant Enterococcus faecalis mutants selected in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2009** Dec;34(6):605-6.

- Déterminer le mécanisme d'action de la lipiarmycine.

Il s'agit de déterminer précisément l'étape du cycle transcriptionnel ciblé par la molécule, les interactions impliquées. Cette étude permet également de déterminer si les mutations localisées au niveau de certains domaines de l'ARN polymérase et rapportées précédemment confèrent des résistances à la lipiarmycine par diminution de l'affinité entre la molécule et son site de liaison ou si la lipiarmycine affecte la fonction du domaine ciblé. L'effet de ces mutations sur l'inhibition de la transcription par la lipiarmycine est également exploré. L'article suivant rapporte nos résultats concernant le mécanisme d'action de la lipiarmycine :

Tupin A., Gualtieri M., Leonetti JP., Brodolin K. The transcription inhibitor lipiarmycin blocks DNA fitting into the RNA polymerase catalytic site. *EMBO J.* **2010** Aug 4;29(15):2527-37.

Afin de faciliter la compréhension des travaux présentés dans cette thèse, il m'a semblé nécessaire de rappeler dans une introduction bibliographique différentes notions liées à mon projet de recherche. Ce projet a un aspect très mécanistique puisqu'il vise à décrire l'effet de la lipiarmycine sur le fonctionnement de l'ARN polymérase. Cependant il s'inscrit dans le cadre plus large de la recherche d'antibiotiques destinés à lutter contre les bactéries résistantes et persistantes. En effet, puisque la compréhension du mécanisme d'action d'inhibiteurs de la transcription connus et la détermination de l'effet des mutations conférant des résistances à cet antibiotique sur ce mécanisme améliorent les connaissent permettant par la suite de produire de nouveaux inhibiteurs

possédant des propriétés intéressantes dans le cadre de la lutte contre les bactéries. Dans une première partie j'ai donc présenté le contexte général de cette « course aux armements » contre les bactéries résistantes et persistantes et exposé pourquoi l'ARN polymérase nous semble être une cible pertinente pour des antibiotiques. Par la suite, j'ai décrit la structure de cette enzyme et le rôle des différents domaines qui la constituent. Afin d'éviter les traductions approximatives, j'ai choisi de conserver la dénomination anglaise de ces domaines. Les différentes étapes du cycle transcriptionnel ainsi que les différents inhibiteurs de l'ARN polymérase connus ont également été décrits. Dans une deuxième partie, j'ai présenté et discuté l'ensemble de mes résultats. La troisième partie est une discussion qui met en relation les similitudes et différences des résultats exposés dans la partie précédente avec le mécanisme d'action d'autres molécules ainsi que l'implication de ces résultats dans la recherche de molécules capables d'agir sur les bactéries persistantes.

CHAPITRE I : INTRODUCTION

A. L'utilisation de l'ARN polymérase comme cible des antibiotiques et le problème des résistances bactériennes

A.I) Situation actuelle

Le problème lié à la résistance aux antibiotiques a été évoqué dès les années 1940 par le Docteur Flemming lors de la généralisation de l'usage de la pénicilline. Et en effet, nous sommes aujourd'hui confrontés à la montée croissante du nombre de souches bactériennes résistantes à tous les antibiotiques disponibles sur le marché, ces souches sont appelées multi-résistantes. A partir des années 1980 le phénomène devient très marqué dans les hôpitaux et le terme «crise des antibiotiques» est employé. Aujourd'hui, les maladies infectieuses sont la première cause de mortalité dans le monde. La situation est d'autant plus alarmante que l'acquisition de résistance peut être très rapide pour certains antibiotiques et qu'elle est inéluctable. La question n'est donc pas de savoir si une résistance à un nouvel antibiotique mis sur le marché va se produire mais quand celle-ci va se produire (Walsh, Nat. Rev. Microbiol., 2003). La principale raison de la situation actuelle est l'utilisation abusive des antibiotiques. Plusieurs études ont montré qu'il y avait une corrélation directe entre l'utilisation d'antimicrobiens et la proportion de résistance (Goossens, Lancet, 2005). Le milieu hospitalier est particulièrement favorable à l'apparition et à la dissémination de souches multirésistantes. L'industrie alimentaire est aussi un consommateur très important d'antibiotiques pour le traitement des animaux destinés à la consommation. En général, la résistance se développe deux ou trois ans après l'introduction d'un antibiotique en usage clinique, mais elle peut se déclarer au bout de quelques mois. L'industrie pharmaceutique doit donc être en mesure de proposer régulièrement de nouvelles molécules afin de contrer ces phénomènes de résistance. Or, la plupart des classes d'antibiotiques utilisés de nos jours ont été découvertes entre les années 1940 et les années 1970. Puis, pendant de nombreuses années aucune nouvelle classe n'a été introduite sur le marché. Seulement trois molécules ont été introduites depuis les années 2000.

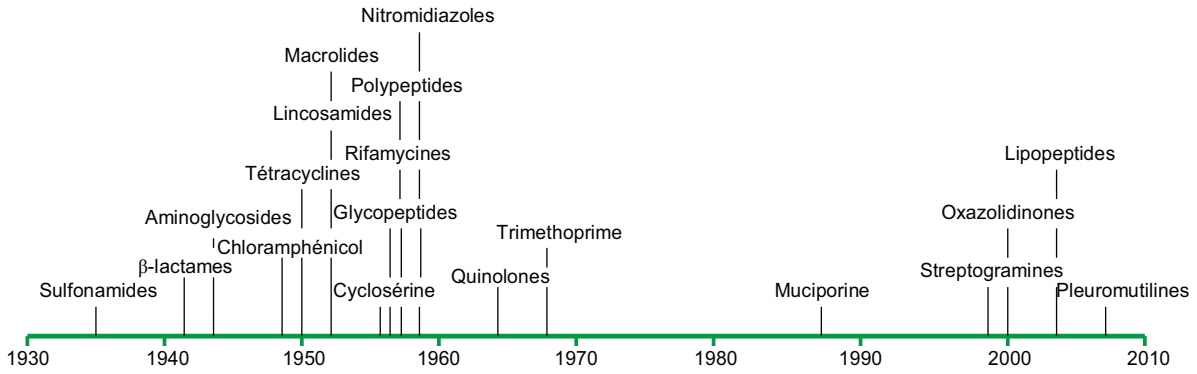


Figure 1 : Les différentes classes d'antibiotiques introduites en thérapie humaine entre 1935 et nos jours.

Cette situation traduit le désintérêt des industries pharmaceutiques pour la recherche pharmaceutique. Ce désintérêt est dû au fait que le marché des antibiotiques est un marché risqué pour les industriels car il n'y a aucune garantie que la molécule soit efficace ni que l'investissement fourni soit remboursé.

A.II) Les causes de la résistance bactérienne : les facteurs liés aux bactéries

La plupart des bactéries ont plusieurs mécanismes de résistance pour chaque antibiotique. Une fois résistantes elles vont facilement pouvoir propager cette résistance par division cellulaire (transfert vertical) et par transfert d'ADN d'une bactérie à l'autre (transfert horizontal) (Livermore, Clin. Infect. Dis., 2003).

A.II)1. La résistance intrinsèque

Elle est due aux propriétés intrinsèques des bactéries, indépendamment des mutations. Par exemple, les bactéries à Gram-positif sont naturellement résistantes aux macrolides grâce à l'imperméabilité de leur paroi à ces molécules.

A.II)2. La résistance acquise

A.II)2.1) Les mutations

Les mutations conférant des résistances aux antibiotiques peuvent survenir sur le chromosome bactérien ou, à plus haute fréquence, sur les plasmides. La plupart des antibiotiques utilisés peuvent être classés selon quatre modes d'action généraux: interférence dans la synthèse de la paroi bactérienne (β-lactames, glycopeptides), inhibition de la synthèse des acides nucléiques ADN (fluoroquinolones) ou ARN (rifampicines), inhibition de la synthèse des protéines (chloramphénicol, tétracyclines), inhibition de la voie métabolique (sulfonamides). Les mutations conférant une résistance à ces antibiotiques ont donc pour conséquence de les empêcher d'exercer leur action sur ces cibles: en limitant leur entrée à l'intérieur des bactéries ou en favorisant leur expulsion par la synthèse de pompes, en désactivant l'antibiotique ou en induisant des changements de conformation au niveau de la cible des antibiotiques afin d'inhiber leur reconnaissance (Tenover, Am. J. Infect. Control, 2006 ; Walsh, Nature, 2000). Des mutants résistants apparaissent spontanément avec une fréquence moyenne de 10^{-6} à 10^{-8} paires de bases.

A.II)2.2) Les transferts

Le transfert d'ADN d'une bactérie à l'autre est un phénomène critique pour la dissémination des résistances. Il se fait souvent via un plasmide portant un ou plusieurs gènes de résistance, par contact entre les bactéries (conjugaison), mais aussi par infection par des bactériophages (transduction) ou d'ADN libre (transformation) (Furuya, Nat. Rev. Microbiol., 2006). Dans les plasmides, les gènes de résistances sont souvent portés dans des transposons (ou éléments transposables). Ces transposons jouent un rôle majeur dans la production de plasmides à résistances multiples en s'accumulant au niveau des nombreux sites d'insertion contenus dans ces plasmides. Ils peuvent également se déplacer entre les plasmides et le chromosome bactérien, entrainant une dissémination encore plus importante de la résistance. Les transposons représentent donc un facteur majeur de la dissémination de la résistance.

A.II)3. Le phénomène de persistance

L'existence de bactéries persistantes (ou persisters) a été rapportée en 1944 par Joseph W. Bigger à la suite d'expériences impliquant le traitement de cultures de Staphylocoques à la

pénicilline. Ces expériences ont montré que l'exposition prolongée à une forte concentration d'antibiotique (de 1/24 unités par c.cm à 1 unité par c.cm) éliminait la majorité de la population bactérienne mais était inefficace contre une petite portion de cette population, estimée à 10^{-6} cellules (Bigger, Lancet, 1944). Il a été déduit de ces expériences que les bactéries persistantes représentent une sous-population bactérienne capable de résister à un traitement prolongé en présence d'une forte concentration d'antibiotique. Mais, contrairement aux bactéries résistantes, ces bactéries sont génétiquement identiques aux bactéries sensibles présentes dans la même culture, elles ne peuvent donc pas être considérées comme des bactéries résistantes au sens génétique du terme. Il s'agirait plutôt de variants phénotypiques tolérants à la plupart des antibiotiques, qui constituent une petite fraction (~1%) préexistante de toutes les populations bactériennes étudiées à ce jour (Lewis, Antimicrob. Agents Chemother., 2001). Elles sont notamment présentes au sein des biofilms. Mise en culture, cette petite fraction entre en division et reconstitue une population bactérienne identique à l'originale, composée également d'environ 1% de bactéries persistantes (Bigger, Lancet, 1944). L'état physiologique de ces bactéries est difficile à décrire car elles ne représentent pas un stade particulier du cycle cellulaire (Wiuff, Antimicrob. Agents Chemother., 2005) et la plupart des bactéries en phase stationnaire ne sont pas des persisters, on dit qu'elles sont en « dormance ». Cependant, la production de cellules persistantes semble être en partie dépendante de la phase de croissance (Lewis, Biochemistry, 2005). Constante au début de la phase exponentielle, la population de persisters augmente lors de l'entrée en phase stationnaire (Wiuff, Antimicrob. Agents Chemother., 2005). Deux catégories de persisters ont été identifiées: la catégorie I est composée d'une sous-population de cellules qui ne se divisent pas et sont générées en phase stationnaire, et la catégorie II est constituée d'une sous-population qui se divise lentement de façon continue, sans passer par le stade stationnaire (Dhar, Curr. Opin. Microbiol., 2007). Le profil d'expression des persiters est différent de celui des bactéries en phase stationnaire (Shah, BMC Microbiology, 2006), néanmoins, l'expression des gènes en phase de persistance semble aussi être sous le contrôle du facteur de transcription σ^{38}. Cet état physiologique particulier serait responsable de la tolérance des bactéries aux antibiotiques. En effet, ceux-ci sont actifs sur des bactéries en phase exponentielle en compromettant la fonction de leur cible (réplication, synthèse de la paroi cellulaire, etc.). Or, lors l'état de « dormance » caractéristique des bactéries persistantes, ces cibles ne fonctionnent pas ou peu, les antibiotiques ne peuvent donc pas agir (Lewis, Biochemistry, 2005). Un certain nombre de gènes ont été identifiés comme étant responsables du phénomène de persistance (Shah, BMC Microbiology, 2006). Parmi ces gènes se trouvent plusieurs modules TA (pour toxine-antitoxine) qui forment un opéron de deux gènes codant pour une toxine stable et une antitoxine dégradable et qui sont surexprimés chez les bactéries persistantes. La toxine est une protéine qui inhibe une

fonction cellulaire essentielle telle que la réplication de l'ADN ou la traduction et entraîne par conséquent la sortie de la phase exponentielle. Lorsque l'antitoxine est exprimée, les deux molécules s'associent et forment un complexe inactif. Parmi ces modules on trouve RelBE, MazEF DinJ (Keren, J. Bacteriol., 2004 ; Shah, BMC Microbiology, 2006) et le module putatif HipAB (Moyed, J. Bacteriol., 1983 ; Lewis, Biochemistry, 2005). Le module TA le plus étudié chez *E. coli* est RelBE. RelE clive l'ARN messager au niveau des ribosomes et arrête ainsi la synthèse des protéines (Pedersen, Cell, 2003). En corrélation avec ces données, il a été proposé que les toxines produites par les bactéries persistantes corrompent les cibles des antibiotiques et préviennent ainsi leur action. D'autres gènes surexprimés chez les persisters codent pour la réponse SOS de réparation de l'ADN, de choc thermique, etc. Pour être efficaces contre les bactéries persistantes les antibiotiques devront donc cibler les produits de ces gènes ou agir sur l'interaction ARNP-σ^{38}.

A.II)4. La formation des biofilms (revues Lewis, Antimicrob. Agents Chemother., 2001 ; Lewis, Nat. Rev. Microbiol., 2007)

65% des infections bactériennes chez l'homme impliqueraient des biofilms. Ce haut pourcentage implique majoritairement des infections de l'appareil urinaire, la formation de la plaque dentaire, des infections auditives, et des infections dues au matériel hospitalier comme les cathéters. Les biofilms sont formés à partir d'une population bactérienne qui se fixe sur une surface et sécrète une matrice exopolysaccharidique qui entoure les bactéries et les protège des conditions hostiles de l'environnement. Du fait même de leur structure, les biofilms sont résistants à un grand nombre d'antibiotiques. Or, à quelques exceptions près, les bactéries planctoniques dérivées de ces biofilms sont sensibles à ces antibiotiques. Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer la résistance des biofilms:

- La diffusion limitée des molécules à travers la matrice polysaccharidique: La structure de la matrice bloque l'entrée de grosses molécules et l'exopolysaccharide chargé négativement lie les antibiotiques aminoglycosides chargés positivement, les retenant à la surface du biofilm. La matrice bloque également l'entrée des composants du système immunitaire. Dans le cas des petites molécules, la présence de la matrice ne fait que ralentir leur action sur les bactéries. Mais, le ralentissement de leur diffusion à travers la matrice permet de diminuer la concentration d'antibiotique pénétrant le biofilm et leur dégradation par des enzymes, tels que les β-lactamases. Cependant, certaines molécules sont résistantes à cette dégradation. C'est le cas des antibiotiques de la famille des fluoroquinolones qui

s'équilibrent rapidement à travers le biofilm et stoppent sa croissance de manière très efficace.

- La présence au sein du biofilm de bactéries dites persistantes: La majorité des bactéries constituant les biofilms est éliminée à une concentration moyenne en antibiotique ≤ 5µg/mL. Mais, après une diminution de 3 à 4 log du nombre de cellules, une petite fraction de bactéries persiste même après augmentation de la concentration en antibiotique. Dans des conditions de cellules planctoniques les bactéries persistantes survivant à l'action des antibiotiques ne posent pas de problème majeur car elles sont éliminées par le système immunitaire de l'hôte. Mais, en condition de biofilm, le système immunitaire ne peut pas franchir la matrice polysaccharidique, permettant aux bactéries survivantes de reformer le biofilm.
- La présence de bactéries en phase stationnaire: Les bactéries situées à distance de la surface du biofilm ont un apport en nutriments insuffisant causant l'expression de protéines de stress et induisant leur entrée en phase stationnaire. Or, un certain nombre d'antibiotiques, comme la pénicilline et l'ampicilline, agissent exclusivement sur des bactéries en division. En effet, les bactéries en phase stationnaire ont peu d'activité de synthèse de paroi bactérienne, de traduction, etc. Durant cette phase, les antibiotiques pourront donc se lier à leurs cibles mais seront incapables d'inhiber leurs fonctions. D'autres molécules, comme les céphalosporines, les aminoglycosides et les fluoroquinolones, ont un effet sur des bactéries ne se divisant pas mais de façon moindre que pour des bactéries en division.

La présence des biofilms est donc un problème majeur en clinique et notamment dans le milieu hospitalier en raison de la contamination du matériel médical.

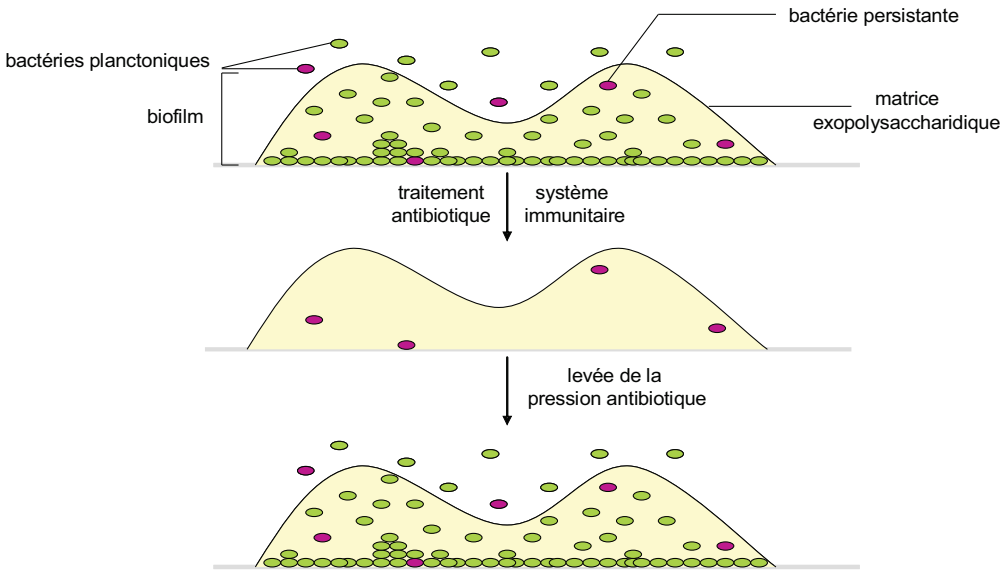


Figure 2 : Résistance des biofilms aux antibiotiques : le rôle des bactéries persistantes.

A.III) Les sources des nouveaux antibiotiques

Les molécules en essai clinique aujourd'hui sont pour la plupart des dérivés des classes chimiques pour lesquelles il y a déjà des mécanismes de résistance. Or, bien que cette méthode soit historiquement la méthode de choix, les modifications structurales apportées à la molécule ne changent pas de façon significative ses interactions avec sa cible (Payne, Nat. Rev. Drug Discov., 2007).

A.III)1. Les antibiotiques naturels

Depuis le début de l'utilisation des antibiotiques, les molécules naturelles constituent la principale source d'antibiotiques. Pourtant, la recherche de nouvelles molécules naturelles a connu un certain déclin au cours des deux dernières décennies au profit de molécules synthétiques avant de montrer un regain d'intérêt. Le retour aux produits naturels est dû à leur incroyable diversité structurale, de propriétés biochimiques ainsi qu'à d'autres propriétés moléculaires que ne présentent pas les molécules synthétiques (Koehn, Nat. Rev. Drug Discov., 2005). De plus, le réservoir de molécules naturelles paraît inépuisable lorsqu'on considère que l'on ne connait que 12% des bactéries vivant sur Terre (Lansing, Microbiologie, 2003, page 993). Et, les progrès méthodologiques permettent maintenant une meilleure séparation des complexes de molécules produits par les micro-organismes et leurs modifications afin d'obtenir des molécules présentant les qualités nécessaires à une molécule utilisable en thérapie ou afin d'augmenter leur efficacité (Koehn, Nat. Rev. Drug Discov., 2005).

Cependant, leur utilisation rend d'autant plus inévitable le phénomène de résistance car ils sont produits par des microorganismes, souvent des bactéries du sol résistantes à leur propre production d'antibiotiques, constituant ainsi un réservoir de gènes de résistance. D'autre part, l'utilisation d'une méthodologie de criblage à grande échelle est peu compatible avec l'utilisation des produits naturels.

A.III)2. Les antibiotiques synthétiques

Les progrès de la chimie combinatoire et du criblage à haute vitesse ont permis de constituer des librairies de molécules synthétiques. Ces molécules présentent l'intérêt d'un faible coût de production, de pouvoir facilement être produites en grande quantité, d'avoir des structures connues, de déjà présenter des propriétés de médicament potentiel et d'être facilement modifiables. Cependant, elles n'ont pas la diversité structurale des produits naturels et une bonne affinité molécule-cible lors des tests de criblage ne se traduit pas nécessairement par une bonne activité *in vivo*.

A.IV) Pourquoi est-il important de comprendre le mécanisme d'action des antibiotiques ?

Un certain nombre de molécules sont actuellement en phase de développement clinique, mais pour certaines, comme la lipiarmycine (en phase III pour le traitement de *Clostridium difficile*), leur mécanisme d'action reste inconnu. Or, comprendre leur mécanisme d'action est important. L'apparition de résistants étant inévitable, l'élucidation de la structure, de la cible, et la compréhension du mécanisme d'action des molécules utilisées en clinique aide à déterminer le mécanisme de résistance utilisé par les bactéries pour chaque antibiotique. Ces mutations peuvent toucher le site de liaison, inhibant ainsi la fixation de l'antibiotique, induire la surproduction de pompes à efflux induisant son relargage en dehors de la cellule, etc. En conséquence, ces données permettent de modifier la structure de l'antibiotique afin de contourner à court terme la résistance ou de trouver des antibiotiques agissant sur une autre cible afin d'éviter de créer des résistances croisées entre plusieurs antibiotiques traitant la même infection.

A.V) L'ARN polymérase comme cible de ces antibiotiques

L'ARN polymérase (ARNP) bactérienne est une grosse enzyme d'environ 400 kDa responsable de la transcription des gènes en ARN. Elle est la cible d'une dizaine de molécules mais, actuellement, seuls la rifampicine et ses dérivés sont utilisés en usage clinique pour le traitement de la tuberculose et pour certaines autres infections. Là encore, la forte propension des bactéries à créer des résistances contre cette classe d'antibiotiques limite fortement leur utilisation. Le nombre de molécules ciblant l'ARNP est faible en comparaison avec d'autres cibles. Pourtant, l'ARNP est une cible particulièrement intéressante pour des antibiotiques potentiels.

- Tout d'abord, le rôle central qu'elle joue dans la transcription en fait une enzyme essentielle pour la survie des bactéries. La relation étroite qui existe entre la réplication, la transcription, la traduction et la réparation de l'ADN permet de perturber l'ensemble des fonctions du contrôle des gènes bactériens en ciblant une seule molécule. En inhibant les fonctions de transcription, les antibiotiques empêchent la bactérie d'exprimer les gènes codant pour les fonctions de base, des protéines nécessaires à l'adaptation des bactéries à certaines conditions de stress, de l'ADN polymérase nécessaire à la réplication, etc.
- Bien que la structure globale des ARNPs procaryotes et eucaryotes présente une forte homologie, leurs séquences diffèrent fortement. En conséquence la plupart des inhibiteurs actifs contre l'ARNP des bactéries ne le seront pas sur les ARNP de leur hôte. Il est donc possible d'administrer ces antibiotiques aux patients sans risque d'interférence avec leurs propres enzymes.
- Contrairement aux eucaryotes qui en possèdent trois, il n'y a qu'une seule ARNP chez les bactéries qui contrôle la transcription de tous les gènes de la cellule. Du fait de son rôle essentiel chez les bactéries, celle-ci est fortement conservée parmi les différentes espèces. Un même antibiotique pourra donc être actif contre plusieurs espèces bactériennes. Cette propriété est à double tranchant. Bien qu'elle présente un avantage à court terme car une seule molécule pourra traiter plusieurs infections, son utilisation à large échelle sur plusieurs espèces bactériennes favorisera l'apparition et la dissémination de résistants.
- Le nombre de molécules connues ciblant l'ARNP est assez faible par rapport à celles dirigées vers d'autres cibles telles que la synthèse de la paroi cellulaire et la plupart des molécules dont le site de fixation est connu se lient dans un environnement spatial assez proche, laissant de nombreux sites inexploités.
- L'ARNP bactérienne est une grosse protéine composée de plusieurs sous-unités et de différents domaines qui interagissent entre eux grâce à de nombreux repliements secondaires. Cette structure particulière de l'enzyme crée de nombreuses poches de liaison potentielles pour les inhibiteurs. Il est donc possible que dans les années à venir de nouvelles molécules ciblant certaines de ces poches soient découvertes.
- La reconnaissance spécifique de certains gènes par l'ARNP se fait par l'intermédiaire d'une sous-unité dissociable, la sous-unité σ. La diversité des facteurs σ permet à la bactérie de répondre de manière spécifique aux changements de l'environnement en reprogrammant l'expression de certains gènes. En sélectionnant par criblage des molécules ciblant l'interaction σ-core il serait possible de mettre sur le marché des antibiotiques ciblant certaines activités spécifiques des bactéries ou des antibiotiques actifs sur des bactéries en

phase stationnaire, comme les bactéries persistantes et les bactéries composant les biofilms. Cette stratégie a permis d'identifier un certain nombre de molécules synthétiques aux propriétés intéressantes (André, J. Antimicrob. Chemother., 2006).

B. L'ARN polymérase

L'ARNP ADN dépendante est la principale enzyme responsable du processus de transcription, qui aboutit à la synthèse d'ARN à partir d'une matrice ADN. De ce fait, il s'agit d'une enzyme essentielle à la vie des cellules procaryotes et eucaryotes et elle est la cible de nombreuses voies de régulation dans le contrôle de l'expression des gènes. Les procaryotes possèdent un seul type d'ARNP qui est responsable de la synthèse de tous les ARN de la cellule (ARN messagers, ARN ribosomaux et ARN de transfert), contrairement aux eucaryotes qui nécessitent trois types d'ARNP. L'ARNP bactérienne existe sous deux formes : le core et l'holoenzyme. La structure de l'ARNP de *Thermus aquaticus* a été résolue pour la première fois en 1999 (Zhang, Cell, 1999), la structure de l'ARNP de *Thermus thermophilus* a elle été résolue en 2002 (Vassylyev, Nature, 2002).

B.I) Le core de l'ARN polymérase

B.I)1. Les différentes sous-unités formant le core

Contrairement à l'ARNP eucaryote qui en compte au minimum 12, le core de l'ARNP bactérienne est constitué de 5 sous-unités polypeptidiques ($\alpha_2\beta\beta'\omega$) qui forment une protéine d'environ 400 kDa:

- α (329 acides aminés soit 35 kDa)
- β (1342 acides aminés soit 150 kDa)
- β' (1407 acides aminés soit 155 kDa)
- ω (90 acides aminés soit 10 kDa)

Bien que le core de l'enzyme soit catalytiquement actif, il est incapable d'initier la transcription *de novo* sans la liaison d'une sous-unité supplémentaire, le facteur σ.

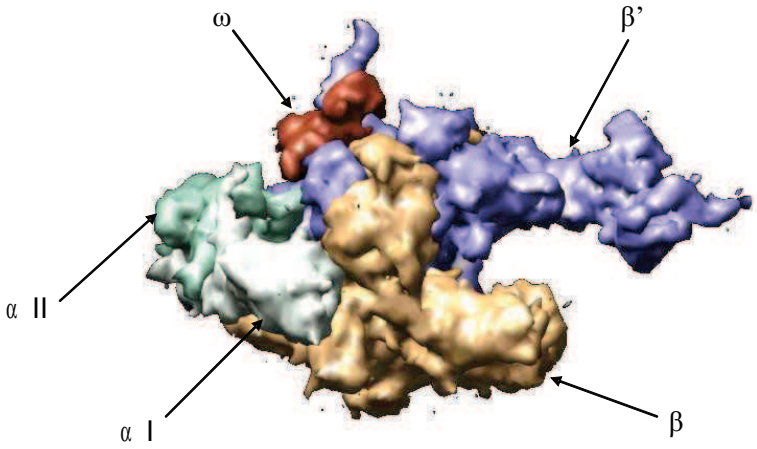


Figure 3 : Structure 3D du core de *T. thermophilus*.

B.I)1.1) La sous-unité α (revues: Ebright, Curr. Opin. Genet. Dev., 1995, Gourse, Mol. Microbiol., 2000)

L'ARNP possède deux sous-unités α qui ont des séquences en acides aminés identiques mais qui possèdent des fonctions différentes. Une sous-unité contacte principalement la sous-unité β tandis que l'autre contacte principalement la sous-unité β' (Zhang, Cell, 1999). Cette différence d'interaction crée une asymétrie au niveau du core de l'enzyme.

Ces sous-unités sont codées par le gène *rpoA* et sont constituées de 2 domaines indépendants (αNTD et αCTD) reliés entre eux par un «linker» non structuré et/ou flexible de 13-36 acides aminés qui permet au domaine αCTD d'adopter différentes positions.

- Le domaine amino-terminal αNTD commence au 8e acide aminé et est constitué de 20 à 40% d'hélices α et d'environ 20% de feuillets β. Son poids moléculaire est de 28 kDa.
- Le domaine carboxy-terminal αCTD qui commence environ au 249e acide aminé et est constitué de 30 à 50% d'hélices α et de 0 à 10 % de feuillets β. Son poids moléculaire est de 8 kDa.

La sous-unité α de l'ARNP possède au moins trois fonctions essentielles :

- **Assemblage de l'ARNP** : la sous-unité α permet l'initiation de l'assemblage de l'ARNP (Igarashi, J. Mol. Biol., 1991 ; Hayward, J. Mol. Biol., 1991) selon le schéma $2\alpha \rightarrow \alpha_2 \rightarrow \alpha_2\beta \rightarrow \alpha_2\beta\beta' \rightarrow \alpha_2\beta\beta'\sigma$, avec un des monomères α qui contacte exclusivement la sous-unité β alors que l'autre contacte exclusivement la sous-unité β' (Zhang, Cell, 1999). Les principaux déterminants de la dimérisation de α ainsi que tous les déterminants pour

l'interaction entre α et les autres sous-unités de l'ARNP sont localisés au niveau du domaine αNTD. Un autre déterminant, secondaire et indépendant, est localisé au niveau du domaine αCTD.

- **Interaction avec l'ADN** : la sous-unité α reconnaît de façon séquence spécifique un élément de promoteur supplémentaire, l'élément amont (élément UP) présent en amont de l'élément -35 chez certains groupes de promoteurs, notamment chez le promoteur ARN ribosomal *rrnB* P1. α interagit directement avec l'élément UP. L'analyse en footprint de ces interactions indique que la sous-unité α protège deux sections de l'élément UP centrées vers -42 et -52 pour le promoteur *rrnB* P1 (Estrem, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998). Les éléments d'interaction de α avec l'élément UP sont localisés au niveau du domaine αCTD (L262, R265, N268, C269, G296, K298, S299) (Gaal, Genes Dev., 1996 ; Murakami, Proc. Natl. Acad. Sci., 1997a). Quand il est lié à l'élément UP, le αCTD peut interagir directement avec la région 4.2 de σ liée à l'élément -35 du promoteur (Lonetto, J. Mol. Biol., 1998 ; Ross, Genes Dev., 2003 ; Chen, Mol. Cell, 2003). La séquence ADN reconnue par le αCTD est riche en AT (Rosenberg, Annu. Rev. Genet., 1979) et la séquence consensus a été déterminée en 1998 (−59 nnAAA(A/T)(A/T)T(A/T)TTTTnnAAAAnnn −38) (Estrem, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998). Les domaines αCTDs étant localisés du côté opposé au complexe ARNP-ADN par rapport aux sites d'entrée et de sortie de l'ADN, l'interaction de ces domaines avec les différents éléments du core et du facteur σ impliqués dans la reconnaissance et la fusion du promoteur implique une forte courbure de l'ADN.

- **Interaction avec les activateurs** : Le domaine αCTD interagit directement avec les activateurs qui se lient en amont du promoteur, jouant ainsi un rôle dans la régulation transcriptionnelle (Igarashi, Cell, 1991 ; Igarashi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991). Le site de liaison des activateurs sur l'ADN peut varier. Les protéines CAP (protéines activatrices des gènes cataboliques) qui sont des protéines très étudiées et sont des récepteurs de l'AMP cyclique régulent l'expression d'une centaine de gènes, dont le gène *lac*, en réponse à des changements de concentration intracellulaire de l'AMP cyclique. Les protéines CAP peuvent interagir avec le domaine αNTD grâce aux contacts qui se forment entre la région 2 du CAP et les résidus Q162-Q163-D164-Q165 du αNTD et ainsi faciliter l'ouverture des promoteurs. Elles peuvent aussi interagir avec le domaine αCTD pour faciliter la liaison de l'ARNP au promoteur (Attey, Nucleic Acids Res., 1994 ; Niu, Cell 1996 ; Severinov, Curr. Opin. Microbiol., 2000 ; Murakami, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997b).

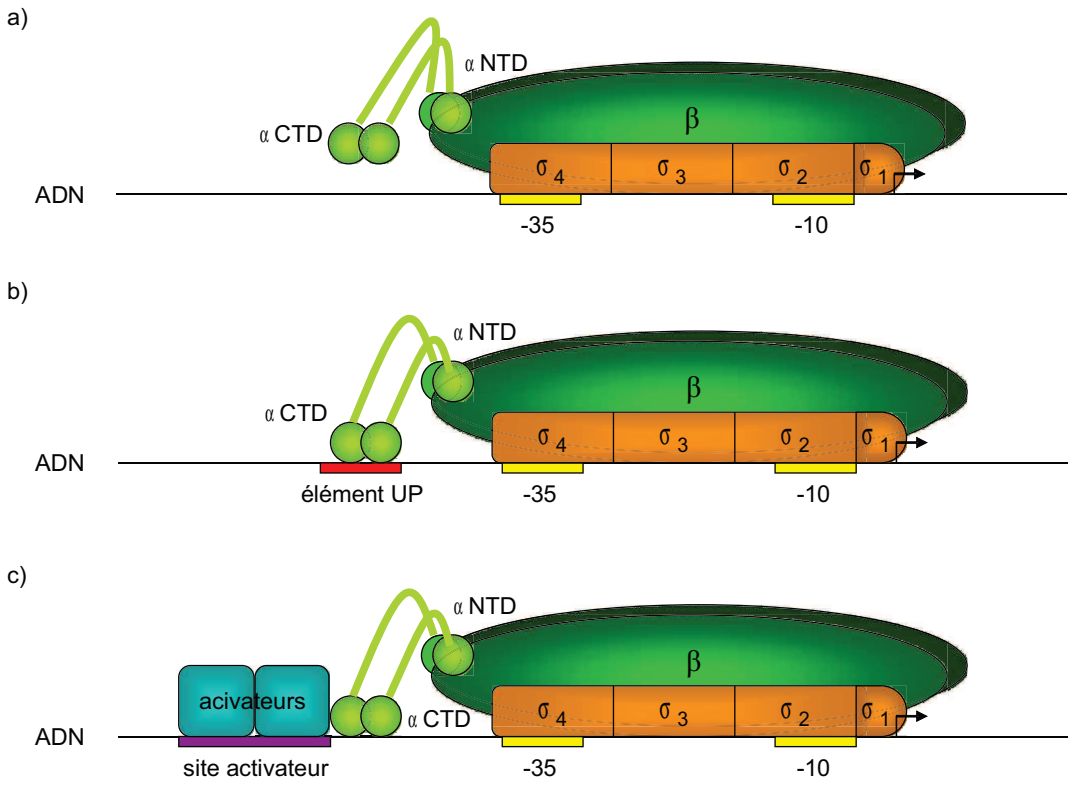


Figure 4 : Rôles des sous-unités α dans a) l'assemblage des sous-unités β et β'. b) la reconnaissance des promoteurs à UP élément et, c) dans l'activation de la transcription.

B.I)1.2) La sous-unité β

La sous-unité β est codée par le gène *rpoB*. Elle est homologue à la sous-unité RPB2 de l'ARNP II de levure. Elle est constituée de 9 régions conservées, identifiées de A à I, et de 2 régions peu conservées (DRI et DRII) qui représentent 25% de la longueur totale de la sous-unité β. Les régions non conservées ne sont pas indispensables aux fonctions de transcription puisque de larges délétions dans ces régions n'inhibent pas les fonctions transcriptionnelles de base (Severinov, Curr. Opin. Microbiol., 2000). La sous-unité β interagit avec différents facteurs ou régulateurs transcriptionnels (Severinov, J. Biol. Chem., 1994 ; Severinov, Curr. Opin. Microbiol., 2000).

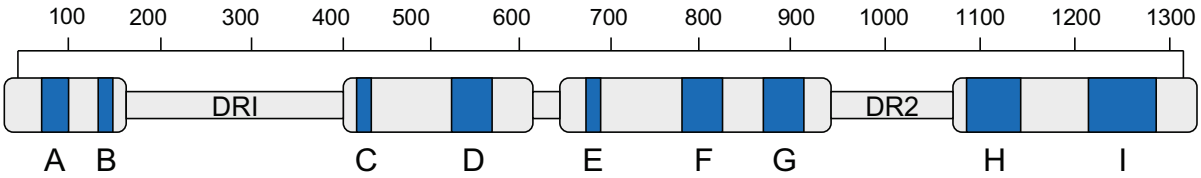


Figure 5 : Représentation schématique des différents segments de la sous-unité β chez *E. coli*. Les zones bleues définissent les régions conservées dans l'évolution.

B.I)1.3) La sous-unité β'

La sous-unité β' est codée par le gène *rpoC*. Elle est homologue à la sous-unité RPB1 de l'ARNP II de levure. Elle est constituée de 8 régions conservées, identifiées de A à H, et de 1 région peu conservée dispensable pour la transcription *in vitro* (DR) (Severinov, Curr. Opin. Microbiol., 2000). Les sous-unités β et β' interagissent de façon extensive,et forment le canal principal de l'enzyme et le site actif. La sous-unité β' interagit également avec plusieurs régulateurs de la transcription tels que la sous-unité σ, les facteurs Gre, N4 SSB (Severinov, Curr. Opin. Microbiol., 2000) et ppGpp (Toulokhonov, J. Biol. Chem., 2001).

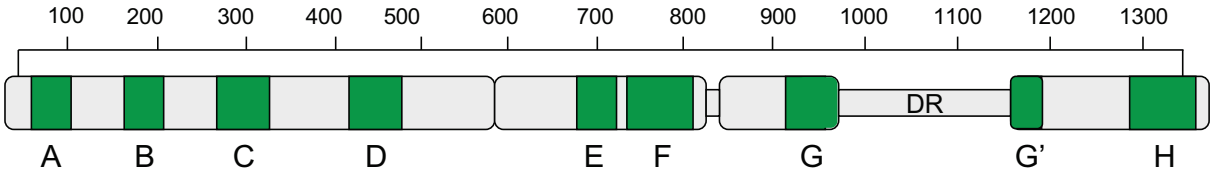


Figure 6 : Représentation schématique des différents segments de la sous-unité β' chez *E. coli*. Les zones vertes définissent les régions conservées dans l'évolution.

B.I)1.4) La sous-unité ω

La sous-unité ω joue elle aussi un rôle dans l'assemblage de l'ARNP. Elle serait nécessaire *in vitro* pour restaurer l'ARNP dénaturée en sa forme fonctionnelle. Cette sous-unité est homologue à la sous-unité RPB6 de l'ARNP II eucaryote (Minakhin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001). Cette sous-unité est enroulée autour de la queue C-terminal de la sous-unité β' (Zhang, Cell, 1999). Elle contacte les régions conservées D et G de la sous-unité β' et participe à son assemblage (Zhang, Cell, 1999 ; Minakhin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001).

B.I)2. Le core de l'ARN polymérase a une structure en « pince de crabe »

B.I)2.1) Structure globale du core

L'ARNP a une structure dite en « pince de crabe » avec une serre de la pince formée par la sous-unité β et l'autre serre formée par la sous-unité β'. L'espace entre les deux serres forme un

canal, appelé canal principal parcourant toute la longueur de l'enzyme et dont le diamètre est d'environ 27 Å. Le core a une taille d'environ 150 Å de long, 110 Å de large et 115 Å de haut (Zhang, Cell, 1999). La surface du core est globalement chargée négativement alors que le canal principal est chargé positivement. Plusieurs domaines entourent cette structure en «pince de crabe». Le dimère αNTD est situé sur la face opposée au canal primaire, à la surface de l'enzyme avec un de ces dimère interagissant avec la sous-unité β alors que l'autre interagit avec la sous-unité β'. La sous-unité ω est aussi localisée à la surface de l'enzyme et s'enroule autour de la queue C-terminale de la sous-unité β'. Enfin, l'ARNP procaryote possède deux domaines de liaison au zinc. Le premier est situé au niveau de la surface supérieure de la sous-unité β' alors que le deuxième est localisé à l'extérieur du canal primaire (Zhang, Cell, 1999 ; Vassylyev, Nature, 2002).

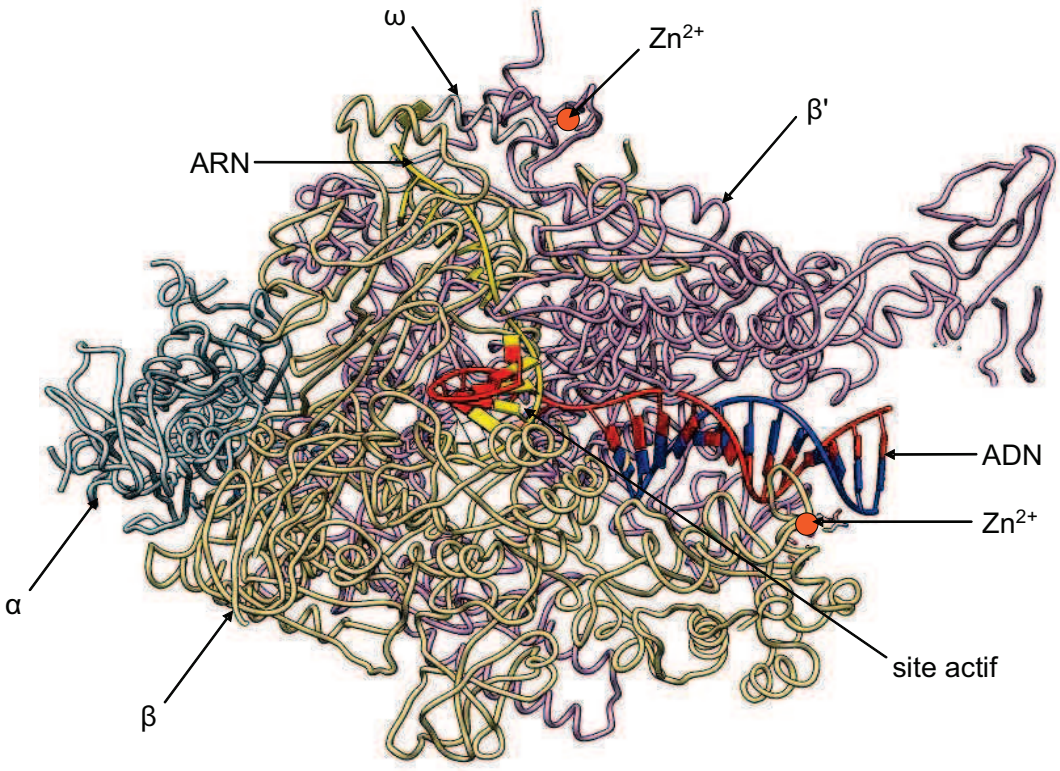


Figure 7 : structure globale de l'ARNP de *T. thermophilus*. La localisation du canal principal est symbolisée par la présence de l'ADN.

B.I)2.2) Les domaines mobiles

Au niveau des sous-unités β et β', la « pince de crabe » est formée par les domaines mobiles du core. Il s'agit du domaine β' « clamp » d'une part, qui peut se refermer autour du canal principal et qui stabilise ainsi les interactions de l'ADN et du complexe ADN : ARN avec le site actif. Et, d'autre part, du domaine β « pincer » lui-même constitué de sous-domaines appelés « lobe » et

« protrusion » dont le mouvement peut également ouvrir ou fermer le canal principal. Le domaine β' « jaw » interagit avec le domaine β' « clamp » pour réguler l'ouverture et la fermeture du canal principal. Le quatrième élément mobile est le β « flap » qui permet d'ouvrir et de fermer le canal de sortie de l'ARN. Dans la structure du complexe ARNP/ADN les domaines β « lobe », β' « jaw » et β' « clamp » forment une cuvette à travers laquelle l'ADN aval est conduit jusqu'au site actif, avec le domaine β « lobe » formant le « toit » de la cuvette et les domaines β' « jaw » et β' « clamp » formant les « murs » (Geszvain, www.bact.wisc.edu/landick). Les changements de conformation des quatre éléments mobiles contribuent à déclencher la séparation des brins d'ADN et/ou à positionner les brins séparés de l'ADN dans le canal catalytique (Wigneshweraraj, J. Biol. Chem., 2005).

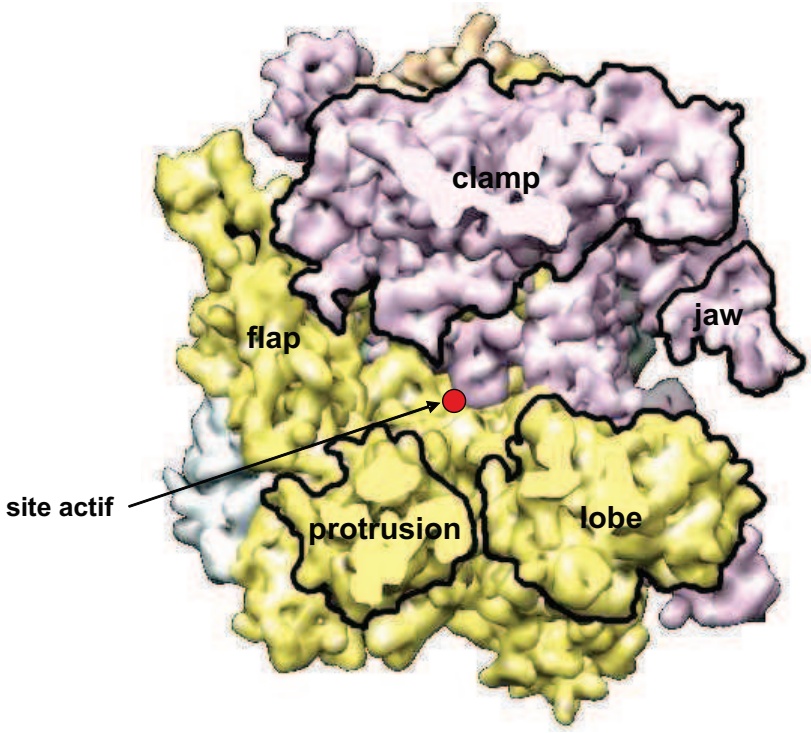


Figure 8 : structure des domaines mobiles de l'ARNP de *T. thermophilus*.

B.I)3. Les différents domaines fonctionnels du core

B.I)3.1) Le domaine β' « bridge-helix »

Ce domaine (β' 1066-1103) est situé à proximité du site actif dans la partie avale du canal principal. La structure globale du domaine « bridge helix » est presque identique dans l'holoenzyme procaryote et dans l'ARNP II, avec une courbure de 28°. Mais elles diffèrent par deux acides aminés

(D1090, S1091) retournés vers le milieu du domaine chez les procaryotes induisant une déstructuration partielle du domaine. La localisation de ces résidus se situe près du site actif. Le domaine « bridge helix » est situé à proximité du domaine « trigger loop » et les deux agiraient de manière interdépendante dans les étapes de catalyse. Le domaine « bridge helix » existe sous deux conformations: droit et coudé. Il a été proposé que la transition de ce domaine d'une conformation droite à une conformation coudée jouait un rôle dans l'étape de translocation de l'ARNP sur l'ADN après la liaison des NTPs (Vassylyev, Nature, 2002). Adjacente à la partie N-terminal du domaine « bridge helix », se trouve une boucle (β' 1039-1067) appelée F loop qui se dirige vers le site actif. Cette boucle contacte directement le domaine « trigger loop » dans le complexe d'élongation. Avec le domaine « bridge helix », certains acides aminés de la sous-unité β et une courte hélice α la précédant, la boucle F formerait un passage qui accommoderait le domaine « trigger loop » replié durant l'addition des nucléotides. La boucle F pourrait donc moduler la catalyse en agissant sur la conformation des domaines « trigger loop » et/ou « bridge helix » (Miropolskaya, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009).

B.I)3.2) Le domaine β' « trigger loop »

Ce domaine (β' 1236-1254) aussi appelé boucle G, est situé à proximité du site actif et du domaine « bridge helix ». Des études structurales ont montré qu'en absence de NTP le domaine « trigger loop » présentait une structure ouverte dont la partie centrale est non structurée. La liaison d'un NTP induit le repliement du domaine en deux segments α-hélice (« trigger helix »), qui, en association avec le domaine « bridge helix » adjacent, forment un « paquet » de trois hélices près du site actif qui interagissent avec le NTP et la matrice ADN. Les résidus M1238, R1239, F1241 et H1242, (numérotation de *T. aquaticus*) du « trigger loop » contactent la base phosphate du NTP entrant alors que les résidus situés au milieu du domaine « bridge helix » contactent la matrice ADN. La conformation en « trigger helix » permet l'alignement correct du NTP avec la terminaison 3'-OH du brin d'ARN, facilitant la catalyse (Vassylyev, Nature, 2007a, b ; Wang, Cell, 2006). Après l'incorporation du NMP et le relargage de PPi l'enzyme doit se déplacer d'un nucléotide en aval pour permettre la liaison du NTP suivant. Ce déplacement est certainement accompagné du retour du « trigger helix » en conformation « trigger loop » et du passage du domaine « bridge helix » de la conformation droite à la conformation coudée. Ces domaines joueraient donc un rôle dans la translocation. Il a aussi été proposé que toutes les réactions catalysées par l'ARNP (addition de NTPs, clivages exonucléolytique et endonucleolytique, et

pyrophosphorolyse) demandaient le repliement du « trigger loop » en « trigger helix ». Cette transition serait donc, avec celle du domaine « bridge helix », un élément central dans la régulation du complexe de transcription (Vassylyev, Nature, 2007a, b ; Miropolskaya, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009). Enfin, le « trigger loop » pourrait jouer un rôle dans l'hydrolyse de la liaison phosphodiester (liaison entre le deuxième et troisième nucléotide) du brin d'ARN et pourrait donc être importante dans l'activité de relecture (proofreading) de l'enzyme (Zenkin, Science, 2006 ; Yuzenkova, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010).

B.I)3.3) Le domaine β' « jaw »

Ce domaine (1149-1190 de *E. coli*) est localisé dans la partie aval de l'ARNP. Il est l'homologue structural du domaine RPB1 « jaw-lobe » de l'ARNP II eucaryote. Avec le domaine β « lobe » il forme un canal contenant l'ADN aval. Le domaine « jaw » établit de contacts importants avec la région dite distale de l'ADN (de +10 à +20), ce domaine étant positionné près du segment d'ADN +15 à +20 du site d'initiation (Ederth, J. Biol. Chem., 2002) permettant le positionnement correct du double brin d'ADN dans le canal conduisant au site actif. Lors de la transcription dépendante de σ^{70} ou de σ^{54}, l'interaction entre le domaine β' « jaw » et la partie avale de l'ADN double brin, conjointement avec le β' « clamp », est importante pour la formation d'un complexe ouvert stable. L'effet de β' « jaw » semble être indirect et passer par le domaine β' « clamp » (Ederth, J. Biol. Chem., 2002 ; Wigneshweraraj, EMBO J., 2004 ; Wigneshweraraj, J. Biol. Chem., 2005). Le domaine « jaw » joue aussi un rôle significatif dans le phénomène de pause lors de la transcription (Ederth, J. Biol. Chem., 2002 ; Ederth, J. Mol. Biol., 2006). Les interactions entre l'ADN aval et le domaine « jaw » pourraient stabiliser l'ARNP en pause, empêcher sa reformation en un état actif et l'isomériser en intermédiaire inactif (Ederth, J. Biol. Chem., 2002). Ce domaine se lie également au domaine « trigger loop » (Ederth, J. Mol. Biol., 2006).

B.I)3.4) Le domaine β' « clamp »

Ce domaine (β'1-617 chez *T. thermophilus*) fait parti des quatre domaines mobiles conservés entourant le site actif. Il peut exister dans plusieurs états conformationnels, allant d'un état complètement fermé à un état complètement ouvert. Avec le domaine « jaw » il restreint l'entrée du double brin d'ADN en aval du canal principal dans une conformation appelée « état fermé du clamp » au niveau du core (Murakami, Sience, 2002b ; Wigneshweraraj, J. Mol. Biol., 2006). La fixation du facteur σ sur le core de l'enzyme induit un certain nombre de changements de

conformation dont la rotation du « clamp » vers le canal principal, réduisant le diamètre du canal à 10 Å. Un modèle d'ouverture du clamp a été proposé par Wigneshweraraj *et al.* (Wigneshweraraj, EMBO J., 2004). L'initiation de la fusion de l'ADN en dehors du canal induirait de façon allostérique des changements de conformation du domaine β' « jaw » qui entraineraient l'ouverture du « clamp ». Cette ouverture faciliterait l'entrée de l'ADN au niveau du canal catalytique et aboutirait à la propagation de la fusion de l'ADN. Dans le canal principal, le domaine « clamp » interagit avec la partie proximale de l'ADN alors que le domaine « jaw » interagit avec la partie distale. La formation d'un complexe ouvert stable, compétent pour la transcription, demande la fermeture du « clamp » afin de renforcer les interactions ARNP/ADN (Wigneshweraraj, J. Mol. Biol., 2006).

En amont du site actif trois boucles forment des protubérances à partir du domaine « clamp » (Cramer, Science, 2001a).

- le domaine « rudder »
- le domaine « lid »
- le domaine « zipper »

Ces trois domaines pourraient jouer un rôle dans la dissociation de l'hybride ADN/ARN et dans la maintenance de la bulle de transcription en amont du site actif.

Les domaines de liaison au zinc

Dans la partie supérieure du domaine « clamp » se trouve une structure en double hélice appelée domaine β' « zinc-finger » ou ZBD (β' 53-81). Ce domaine n'a pas de structure secondaire, sa structure s'apparente à une forme de U comprenant deux longues boucles fixant un ion zinc (Vassylyev, Nature, 2002). L'extrémité N-terminal du ZBD pourrait contacter l'ADN au niveau de l'espace compris entre les éléments -35 et -10 (Murakami, Science, 2002b). La mutation des quatre cystéines en alanine inhibe la fusion de l'ADN (Young, Science, 2004). Dans l'holoenzyme, ce domaine se trouve localisé entre les domaines N-terminal et C-terminal de σ^{70}, près du domaine 4 de σ. Un deuxième domaine de liaison au zinc a été identifié dans l'ARNP procaryote, qui n'est pas conservé dans l'ARNP eucaryote. Ce domaine est composé de quatre cystéines appartenant aux segments F et G de la sous-unité β' et est situé au niveau du « clamp » à l'extérieur du canal, suggérant qu'il pourrait jouer un rôle dans le repliement de la sous-unité β' (Zhang, Cell, 1999 ; Markov, Genes Dev., 1999).

B.I)3.5) Les régions « switch »

Il existe cinq éléments « switch » qui relient le « clamp » aux autres domaines de l'ARNP. Ces éléments « switch » sont des éléments mobiles qui interagissent entre eux et qui ont un rôle de charnière permettant la fermeture et l'ouverture du « clamp ». Les « switchs » 1, 2, 4 et 5 forment la base du « clamp ». Les « switchs » 1 et 2 sont peu structurés dans l'ARNP II libre et le « switch » 3 n'est pas structuré. Mais ces trois « switchs » deviennent structurés dans le complexe d'élongation. Il a été proposé que ces « switchs » couplaient la fermeture du « clamp », la fermeture du canal primaire autour de l'ADN et la liaison à l'ADN (Cramer, Science, 2001).

β' « switch-2 »

Dans l'holoenzyme, l'élément « switch-2 » (β' 327-352 chez *E. coli*) interagit avec la région 3.2 de σ et avec l'ADN. L'élément « switch-2 » pourrait alterner entre différentes conformations (Belogurov, Nature, 2009 ; Mukhopadhyay, Cell, 2008). Des analyses mutationnelles montrent que le résidu R313 (numérotation de *Pyrococcus furiosus*) de l'élément « switch-2 », conservé chez les procaryotes et les eucaryotes, interagit avec l'ADN à la position +2 et est essentielle au positionnement correct du brin matrice dans le site actif. Cet élément semble aussi important pour la séparation de l'ADN durant l'élongation (Naji, Nucleic Acids Res., 2008). Il affecterait également la stabilité du complexe ouvert, sa propagation (Belogurov, Nature, 2009 ; Pupov, Nucleic Acids Res., 2010) et la régulation de sa formation par la protéine DksA (Rutherford, Genes Dev., 2009). Cet élément semble aussi impliqué dans la sélection du site d'initiation, l'initiation abortive, l'échappement du promoteur, et dans l'élongation (Majovski, J. Biol. Chem., 2005 ; Naji, Nucleic Acids Res., 2008 ; Pupov, Nucleic Acids Res., 2010). Le résidu R339 (numérotation chez *E. coli*), qui se situe dans la région du « switch-2 » qui est soumise aux changements de conformation et interagit avec l'ADN, semble particulièrement important pour ces fonctions (Belogurov, Nature, 2009).

B.I)3.6) Le domaine β' « rudder »

Ce domaine fait parti du segment C de la sous-unité β'. Il est situé à proximité du site catalytique. Il est entouré par l'élément « coiled-coil » qui constitue un site de liaison essentiel pour la sous-unité σ et par des résidus conservés, chargés positivement, impliqués dans les interactions avec l'ADN aval (Burgess, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 1998). Le domaine « rudder » contact l'ARN d'une longueur de 8-9 nucléotides et pourrait ainsi stabiliser le brin naissant. La

mutagénèse a montré que cette région est impliquée dans la stabilité du complexe ouvert et dans sa propagation en aval de l'élément -10 du promoteur. Celui-ci ne semble pas impliqué dans l'élongation au sens strict mais il semble jouer un rôle dans la stabilisation du complexe d'élongation en interagissant avec l'ARN naissant en amont de l'hybride ARN-ADN. Il ne semble pas non plus impliqué dans la terminaison de la transcription ou dans le maintien de la longueur de l'hybride ADN/ARN (Kuznedelov, EMBO J., 2002 ; Naryshkina, J. Mol. Biol., 2006 ; Naji, Nucleic Acids Res., 2008).

B.I)3.7) Le domaine β' « lid »

Le domaine « lid » est une région localisée au niveau du segment B de la sous-unité β' et qui forme une boucle de 14 acides aminés sortant du « clamp » et se dirigeant vers la jonction entre le canal principal et le canal de sortie de l'ARN. Il est localisé sur l'ADN à environ 10 pb par rapport au site actif. Il contacte le domaine β « flap » créant ainsi un tunnel entourant l'ARN. Il interagit également avec la région 3 et la région 3.2 de σ qui passe à travers le tunnel crée par l'interaction du « lid » avec la face interne du domaine β « flap » (Vassylyev, Nature, 2002 ; Murakami, Science, 2002a, b). La liaison de la sous-unité σ au core de l'enzyme ainsi que sa dissociation nécessitent le mouvement du « lid » afin de permettre le passage de la région 3.2 dans le canal de sortie de l'ARN ainsi que sa sortie. Le domaine « lid » joue un rôle important dans l'initiation de la transcription en stabilisant le complexe ouvert. Cette stabilisation pourrait être due à des contacts directs entre le « lid » et l'ADN ou par son interaction avec les régions 3 et 3.2. La délétion du « lid » affecte l'initiation de la transcription à partir des promoteurs dépendants et indépendants de la région -35 de l'ADN et affecte la formation du complexe ouvert. Cependant, le domaine « lid » n'est pas strictement essentiel pour l'initiation puisque les effets de la délétion de cette région peuvent être partiellement reversés par l'ajout d'un promoteur consensus incluant un élément UP. Ce domaine ne semble pas non plus jouer de rôle important dans l'élongation, dans la séparation de l'hybride ARN-ADN, et dans la terminaison (Toulokhonov, J. Mol. Biol., 2006 ; Naryshkina, J. Mol. Biol., 2006 ; Naji, Nucleic Acids Res., 2008).

B.I)3.8) Le domaine « zipper »

Le domaine « zipper » fait parti du segment A de la sous-unité β'. Il est situé plus en amont que

les domaines « rudder » et « lid ». Il pourrait être impliqué dans la séparation les brins matrice et non matrice (Gnatt, Science, 2001).

B.I)3.9) Le domaine β « flap »

Ce domaine (β 835-935 chez *E. coli*, β 702-828 chez *T. thermophilus*) est connecté de manière flexible à l'ARNP et entoure le canal de sortie de l'ARN (Zhang, Cell, 1999) (Korzheva, Science, 2000). Il est composé de trois éléments :

- le mur « flap » composé de quatre feuillets β antiparallèles reliés entre eux par des boucles constituant la surface du « flap ».
- les bras flap qui prolongent le mur « flap ».
- l'hélice « flap » qui connecte l'extrémité des bras « flap » entre eux.

Durant l'élongation le mur et les bras « flap » interagissent avec le brin d'ARN naissant dont la structure secondaire en épingle à cheveux est reconnue comme un signal de pause (Wang, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997 ; Toulokhonov, Mol. Cell, 2003). L'extrémité de l'hélice « flap » interagit avec la boucle de l'ARN en épingle en cheveux et est nécessaire pour l'activité de NusA dans l'induction de la pause (Korzheva, Science, 2000 ; Toulokhonov, Science, 2001). La boucle de la pince à cheveux interagit avec le domaine « rudder » puis passe sous le β « flap ». La formation de la structure en épingle à cheveux pourrait initier la terminaison de la transcription en déplaçant le domaine β « flap » et en rompant les interactions entre les acides nucléiques et le domaine « rudder » (Darst, Curr. Opin. Struct. Biol., 2001).

Durant l'initiation le domaine « flap » interagit avec le domaine 4 de σ et permet le positionnement correct de la région 4.2 pour son interaction avec l'élément -35 du promoteur, le domaine αCTD du core et avec les activateurs de la transcription (Kuznedelov, Science, 2002 ; Lonetto, J. Mol. Biol., 1998 ; Ross, Genes Dev., 2003 ; Chen, Mol. Cell, 2003). Il a été montré que l'extrémité de l'hélice « flap » était le principal déterminant de cette interaction (Geszvain, J. Mol. Biol., 2004). L'interaction de la région 4 de σ avec le β « flap » induit la rotation de l'extrémité de l'hélice « flap » d'environ 15° vers le site actif. Les interactions entre la région 4 de σ, le domaine β « flap », et l'élément -35 du promoteur pourraient être facilitées par le domaine β' ZDB. La liaison au facteur σ induit un changement de conformation du domaine β « flap » (Vassylyev, Nature, 2002). L'interaction du domaine β « flap » avec le domaine 4 σ inhiberait l'extension de l'ARN naissant durant l'élongation (Nickels, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005). Il a été proposé que ce domaine pourrait également interagir avec la région 1.1 de σ, cependant, il ne semble pas que cette

interaction joue un rôle dans la formation ou le maintien de l'interaction entre le « flap » et la région 4 de σ (Geszvain, J. Mol. Biol., 2004).

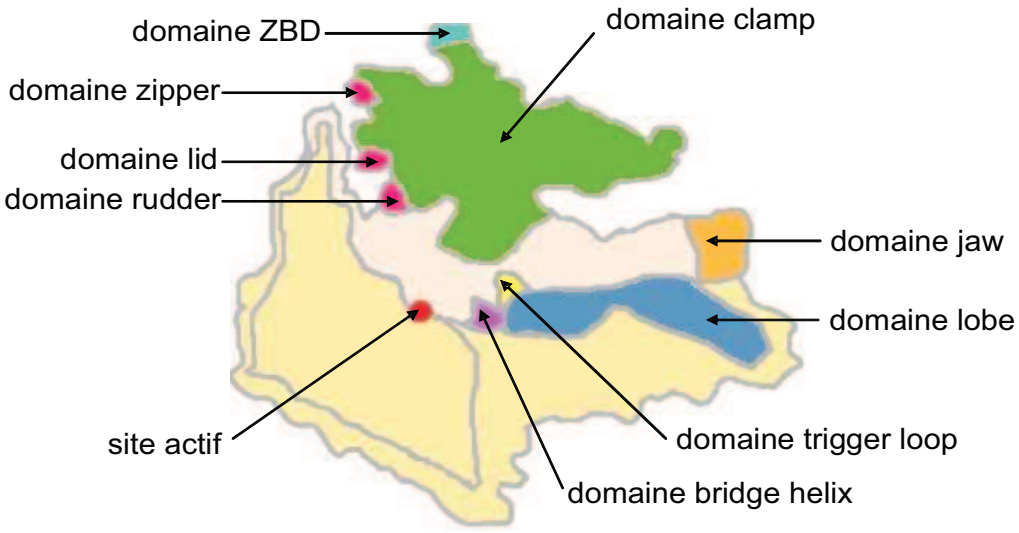


Figure 9 : Les différents domaines constituant le core de l'ARNP.

B.I)4. Les différents canaux formés par les domaines du core

Les différents domaines de l'ARNP délimitent trois canaux : le canal principal, le canal de sortie de l'ARN, et le canal secondaire.

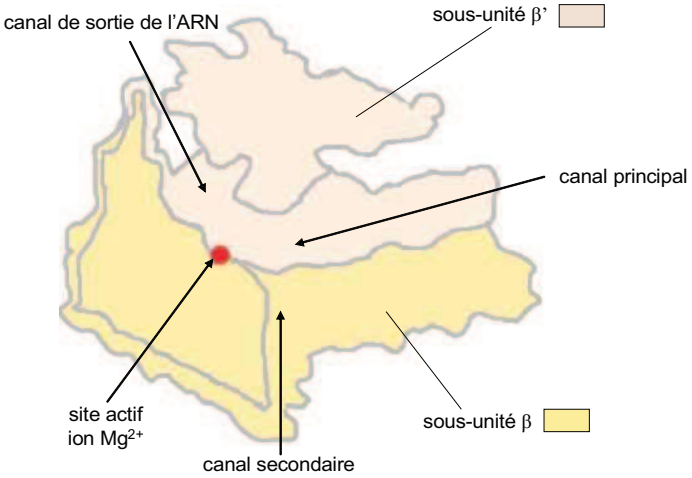


Figure 10 : Positionnement du site actif et des différents canaux dans l'ARNP.

B.I)4.1) Le canal principal ou canal du site actif

Ce canal, formé par le sillon situé entre les sous-unités β et β' est très conservé parmi les

ARNPs car il contient le site catalytique et accommode l'ADN au cours de la transcription. On le divise en deux parties par rapport à la position du site actif et à la position +1 de l'ADN. Ainsi, la partie du canal au niveau de laquelle pénètre l'ADN avant la transcription est appelée partie avale et la partie par laquelle sort l'ADN après transcription est appelée partie amont. En amont du site actif un « mur » formé par le domaine β « flap » bloquerait l'extension de l'hybride ADN/ARN et forcerait le passage de l'ARN dans le canal de sortie de l'ARN. A l'exception du β « flap », les domaines de l'ARNP décrits précédemment bordent le canal principal et sont essentiels à la catalyse et au maintien de la bulle de transcription et de la stabilisation du duplex ADN. Les domaines « bridge helix », « trigger loop », « clamp », « jaw » sont présents en aval du site actif et les domaines « lid », « rudder » et « zipper » sont présents en amont du site actif.

Le site actif

Le site actif ou site catalytique catalyse la réaction d'addition des nucléotides dans la chaine d'ARN en extension. Il est localisé à l'intersection du canal primaire et du canal secondaire. Il contient un ion Mg^{2+} de forte affinité, chélaté, à la base du canal, par trois résidus D faisant partie du motif universellement conservé NADFDGD de la région D de la sous-unité β'. Cet ion est communément appelé Mg^{2+} I et sépare les deux sites de fixation des nucléotides *i* (en amont de l'ion Mg^{2+}) et *i+1* (en aval). Un site E (pour entrée) est situé en aval du site *i+1* et constitue un site de liaison non spécifique pour les NTPs lors de leur entrée dans le canal principal (Sosunov, EMBO J., 2003). Bien qu'absent de la structure cristallisée de *T. aquaticus* (Zhang, Cell, 1999), un deuxième ion Mg^{2+} de faible affinité (Mg^{2+} II) a été cristallisé dans la structure de *T. thermophilus* (Vassylyev, Nature, 2002) et dans celle de l'ARNP II (Cramer, Science, 2001), même si celui-ci est localisé à deux positions différentes. Il a été déterminé que les ions Mg^{2+} I et Mg^{2+} II étaient espacés d'environ 3,9Å (Vassylyev, Nature, 2007). L'ion Mg^{2+} II serait recruté et stabilisé par les nucléotides entrants non complémentaires liés au niveau du site E (Sosunov, EMBO J., 2003) ainsi que par les groupements phosphates et deux des aspartates du motif NADFDGD (D β' 739 et D β' 741 chez *T. thermophilus*, D β' 460 D β' 462 chez *E. coli*) chélatent également l'ion Mg^{2+} I, reliant les deux ions entre eux (Sosunov, EMBO J., 2003 ; Westover, Cell, 2004 ; Artsimovitch, Cell, 2004 ; Vassylyev, Nature, 2007)

Le canal en amont du site actif

Cette partie du canal est située après le site actif. Les différents domaines composant ce canal jouent un rôle dans la stabilité de l'ARN en extension, la séparation des brins ADN et ARN, dans le maintien de l'ADN en structure ouverte et dans la terminaison de la transcription. Comme

décrit précédemment, les trois protubérances du domaine « clamp » qui forment les éléments « rudder », « zipper » et « lid » sont impliquées dans ces fonctions.

Le canal en aval du site actif

Il est formé par les domaines β « lobe », β' « clamp » et β' « jaw » et peut accommoder environ 15-20 pb d'ADN aval. L'entrée du double brin d'ADN dans ce canal est régulée par l'ouverte et la fermeture des domaines β' « clamp » et β' « jaw ». Les interactions entre l' ADN aval et les différents domaines qui composent ce canal jouent un rôle primordial dans la modulation de l'activité de l'enzyme au cours des trois étapes de transcription, et particulièrement pour la formation et le maintien d'un complexe ouvert compétant pour la transcription. Ces contacts peuvent être classés en deux catégories : les contacts proximaux au site actif (de +5 à +8) qui interviennent principalement avec les domaines « clamp » et « lobe », et les contacts distaux au site actif (de +10 à +20) avec les domaines « clamp » et « jaw » (Cramer, Science, 2000 ; Korzheva, Science, 2000 ; Vassylyev, Nature, 2007).

B.I)4.2) Le canal secondaire

Ce canal relie l'extérieur de l'ARNP au site actif. Il débouche immédiatement en aval du site actif et est séparé du canal primaire par le domaine « bridge helix ». Sa largeur de 10-12 Å le rend trop étroit pour accommoder le double brin d'ADN (environ 30 Å) mais sa position est idéale pour permettre l'entrée des NTPs au niveau du site actif. Il a donc été proposé que ce canal servait de canal d'entrée aux nucléotides (Zhang, Cell, 1999 ; Fu, Cell, 1999 ; Cramer, Science, 2000 ; Korzheva, Science, 2000). Ce canal permettrait également le relargage des courts fragments abortifs (Polyakov, J. Mol. Biol., 1998 ; Cramer, science, 2000 ; Korzheva, Science, 2000 ; Severinov, Curr. Opin. Microbiol., 2000).

B.I)4.3) Le canal de sortie de l'ARN

Il est formé par l'espace laissé entre la partie amont du « clamp » et le domaine β « flap » (Zhang, Cell, 1999). Il permet à l'ARN synthétisé d'être séparé de l'hybride ADN/ARN et d'être expulsé en dehors de l'enzyme. Deux structures bloquent ce canal. L'entrée du canal est bloquée par la boucle de la région 3.2 σ^{70} (Vassylyev, Nature, 2002), devant être déplacée pour permettre l'entrée

du brin d'ARN d'une longueur de 10-11 nucléotides. Plus loin, le canal serait obstrué par une partie du domaine β « flap» qui bloquerait le transcrit d'une taille inférieure à 16 nucléotides à l'intérieur du canal et interagirait avec le domaine β' ZBD. Lorsque le brin transcrit atteint une taille de 16 nucléotides, la formation de la structure en épingle à cheveux induirait des changements de conformation permettant l'ouverture du canal par un mouvement du β « flap » (Toulokhonov, Science, 2001 ; Korzheva, Science, 2000).

B.II) L'holoenzyme

Chez les eubactéries l'initiation de la transcription requière la fixation de protéines accessoires, connues sous le nom de facteurs σ, sur le core catalytiquement actif de l'ARNP (Burgess, Nature, 1969). Cette association réversible forme l'holoenzyme. Chez les bactéries à Gram-négatif comme *E. coli* les gènes codant pour les facteurs σ sont désignés *rpo* (RNA polymerase subunit). Chez les Gram-positif les gènes sont désignés *sig*.

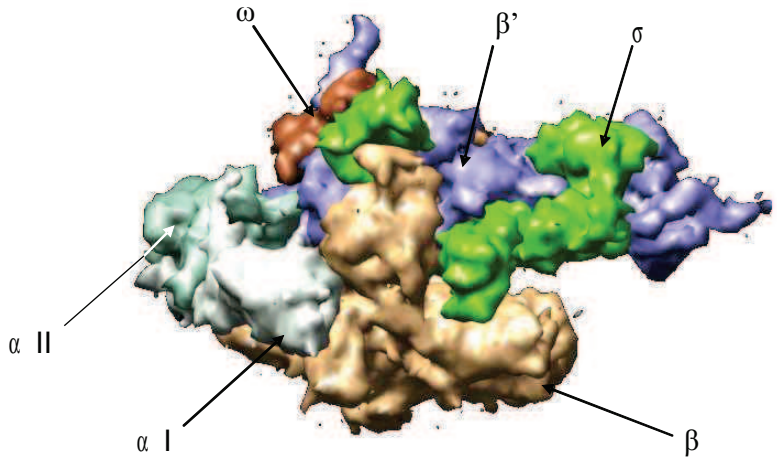


Figure 11 : Structure 3D de l'holoenzyme de *T. thermophilus*.

B.II)1. Les fonctions du facteur σ

Les facteurs σ bactériens ont plusieurs activités biochimiques qui incluent, la liaison au core, la reconnaissance des promoteurs, la fusion de l'ADN et défavorisation de la transcription non spécifique (Helmann, Annu. Rev. Biochem., 1988 ; Chamberlin, Annu. Rev. Biochem., 1974). Tous les facteurs σ connus possèdent au moins les deux premières activités. Sous forme libre, les

interactions entre le facteur σ et l'ADN sont faibles (Burgess, Nature, 1969) mais au cours de l'interaction σ-core, les facteurs σ apportent la plupart si non tous les déterminants permettant la reconnaissance des promoteurs et leur fusion.

Tous les domaines de σ forment des interactions avec le core de l'ARNP aboutissant à une interaction très stable, avec une constante de dissociation estimée à environ 10^{-9} M (Gill, J. Mol. Biol., 1991). Ceci est dû aux nombreuses interactions existant entre σ et le core de l'ARNP, la surface d'interaction est de plus de 8200 Å (Murakami, Science 2002a). Ces contacts impliquent les domaines « clamp » et « flap » d'une part, et les régions 2, 3 et 4 de σ d'autre part. Pourtant, quand l'ARNP entre dans la phase d'élongation, le facteur σ est généralement relâché. Cette propriété est du à la structure même du facteur σ. Les différentes régions de la protéine s'associent indépendamment aux différents domaines du core de sorte que cela produise une liaison de forte affinité sans qu'un domaine particulier de l'interaction σ-core ne soit particulièrement stable. De cette façon, les transitions structurales se produisant lors du passage de l'étape d'initiation à l'étape d'élongation provoquent la dissociation des différents domaines de σ un par un et aboutissent au relâchement du facteur σ (Murakami, Curr. Opin. Struct. Biol., 2003). Les protéines de la famille de σ^{70} sont constituées d'au moins 3 domaines sous forme d'hélice α qui sont reliés entre eux par des bras très flexibles. Cette organisation permet d'obtenir différentes conformations de σ, en ne changeant que la position relative des domaines structuraux entre eux sans changer la conformation des domaines en eux même, notamment lors du passage de l'état libre au contexte de la formation de l'holoenzyme (Borukhov, Res. Microbiol., 2002).

B.II)2. Les différentes familles de facteur σ

Un grand nombre de facteurs σ provenant d'organismes divers ont des séquences d'acides aminés similaires et forment une famille de protéines homologues (Gribskov, Nucleic Acids Res., 1986 ; Stragier, FEBS Lett., 1985). Les facteurs σ peuvent être divisés en deux familles. La première est une famille de type σ^{70}, en référence au principal facteur σ chez *E. coli*. Les différents σ de cette famille partagent des régions de séquences en acides aminés conservées et forment une famille de protéines homologues. Pour reconnaître les promoteurs et initier la transcription, cette famille de σ n'a besoin d'aucun cofacteur ou de ressource d'énergie, contrairement à la deuxième famille de facteurs σ, la famille de σ^{54} ou σ^{N}. Cette famille est fonctionnellement identique à la famille de σ^{70} mais structurellement différente et demande un « enhancer » et de l'énergie sous forme d'ATP ou de GTP afin d'initier la transcription (Buck, J. Bacteriol., 2000 ; Studholme, FEMS

Microbiol. Lett., 2000). Les eubactéries possèdent généralement plusieurs membres de la famille de σ^{70} mais un seul membre de la famille de σ^{54}.

Chez *E. coli*, le nombre de molécules de core dans une cellule en croissance est ~2000 soit moitié moins que le nombre de gènes (~4000) présents dans le génome de la bactérie (Blattner, Science, 1997). Une sélection des gènes à transcrire à un moment donné est donc nécessaire. Cette sélection se fait grâce à plus de 350 facteurs de transcription (Pérez-Rueda , Nucleic Acids Res., 2000) et à la présence de 7 facteurs σ différents: σ^{70} (σ^{D}), σ^{38} (σ^{S}), σ^{32} (σ^{H}), σ^{24} (σ^{E}), σ^{28} (σ^{F}), σ^{fecI} et σ^{54} (σ^{N}) qui sont chacun responsables de la transcription d'un certain nombre de promoteurs, permettant une régulation fine de la transcription. La concentration de chacun des facteurs σ dans la cellule varie selon les conditions de croissance. La spécificité de transcription du core de l'ARNP est modulée en deux étapes : dans un premier temps par interaction avec le facteur σ, puis, dans un deuxième temps, grâce aux facteurs de transcription qui peuvent se lier à l'ADN.

La famille de σ^{70} peut être divisée en 4 sous-groupes sur la base de leur relation phylogénique et de leurs fonctions (Lonetto, J. Bacteriol., 1992) :

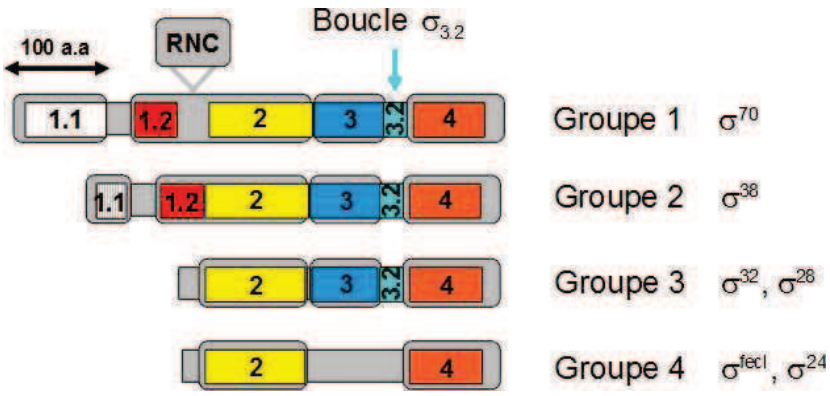


Figure 12 : Représentation schématique de la structure des différents groupes de facteurs σ. Chez σ^{38} les 52 premiers résidus correspondent à une portion très dégénérée de la région 1.1. RNC : région non conservée.

- **Groupe 1** : ce groupe inclus σ^{70} et ses orthologues. Il s'agit de protéines essentielles responsables de la transcription des gènes de ménage, la majorité des gènes d'*E. coli*, permettant la réalisation des fonctions de base de la bactérie. Ces gènes sont transcrits durant la phase de croissance exponentielle de la bactérie. Ce sont les seuls à posséder la région 1.1.

- **Groupe 2** : ce groupe comprend des facteurs σ très étroitement reliés aux σ du groupe 1

mais qui ne sont pas indispensables à la croissance de la bactérie. Le facteur σ^S (σ^{38}) est le représentant le plus étudié de ce groupe. C'est un régulateur général du stress chez *E. coli*. Il est essentiel à la transcription de gènes spécifiques de la phase stationnaire.

- **Groupe 3** : il est constitué de protéines plus divergentes en séquences que le groupe 1 et qui interviennent en réponse à un signal spécifique. Ce groupe peut être divisé en plusieurs sous-groupes fonctionnels ayant un rôle dans,
    - La réponse au choc thermique (σ^{32})
    - La biosynthèse du flagelle (σ^{28})
    - La sporulation

- **Groupe 4** : il s'agit du groupe le plus divergent et qui a le plus grand nombre de représentants. Ces membres n'ont qu'une distante homologie de séquence avec les autres groupes de la famille de σ^{70}. Ils jouent un rôle dans la régulation des gènes contrôlant les fonctions extra-cytoplasmique, telle la présence de protéines non repliées dans le périplasme (σ^{24}) mais ont aussi des fonctions plus spécialisées comme le transport du fer (σ^{fecI}).

Alors que la plupart des bactéries ne possèdent qu'un représentant du groupe 1, le nombre de représentant des autres groupes varie grandement en fonction des caractéristiques physiologiques des différents organismes (Paget, Genome Biology, 2003).

La famille de σ^{54} permet elle la transcription de gènes qui sont activés par le manque d'azote et d'autres gènes de réponse au stress. Elle est largement représentée chez les α et γ-protéobactéries. Chez cette famille, l'activation de la transcription nécessite la reconnaissance d'un élément « enhancer-like » (ELE) constitué d'une séquence palindromique ou quasi-palindromique de 100 à 200 pb en amont des séquences promotrices et qui constituent des sites de liaison pour des activateurs tels que Ntrc et NifA. σ^{54} reconnaît des séquences promotrices centrées autour des positions -12 et -24 et forme un complexe fermé stable, mais a besoin des activateurs pour les étapes d'isomérisation du promoteur en complexe ouvert compétant pour la transcription ainsi que d'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

B.II)3. La régulation de la transcription et les différents facteurs σ

La régulation de la transcription des gènes se fait aussi en fonction du nombre de sous-unités σ disponibles dans la cellule à une phase donnée. La concentration de chaque sous-unité σ varie selon les conditions de croissance de la cellule alors que la concentration de core reste constante. La transcription de la plupart des gènes, dont les gènes essentiels se fait grâce à la sous-unité σ^{70}. En conséquence, la concentration de σ^{70} dans la cellule est assez stable tant en phase exponentielle qu'en phase stationnaire et dans différentes situations de stress (Jishage, J. Bacteriol., 1995 ; Jishage, J. Bacteriol., 1996). Les facteurs σ alternatifs, σ^{54} et σ^{28}, sont aussi présents à une concentration significative durant la phase exponentielle. Par contre, la concentration de σ^{38} augmente pendant la phase stationnaire (Jishage, J. Bacteriol., 1995). La régulation de la transcription se fait également grâce à l'affinité propre de chaque sous-unité pour le core. Parmi les 7 sous-unités présentes chez *E. coli* σ^{70} a la plus grande affinité et σ^{38} a la plus faible (Ishihama, Annu. Rev. Microbiol., 2000). Plusieurs mécanismes permettent d'empêcher la liaison de σ libre avec l'ADN. En premier lieu chacun des trois domaines de liaison à l'ADN de σ ne sont capables de que faible interaction avec les éléments d'ADN qu'ils reconnaissent. Or, dans le σ libre, la distance entre ces différents domaines ne permet pas l'interaction simultanée de ces domaines avec leurs éléments du promoteur respectifs. Ceci n'est possible que sous la forme holoenzyme. Bien que chaque facteur σ puisse reconnaître un certain nombre de promoteurs de manière spécifique, un même promoteur peut être reconnu par des facteurs σ différents, il y a donc un chevauchement de spécificité. Par exemple, le promoteur *gal*P1 peut à la fois être reconnu par σ^{70} et par σ^{38} (Kolb, Nucleic Acids Res., 1995), lui permettant d'être exprimé en phase exponentielle et en phase stationnaire ou en condition de stress.

Enfin, une ou plusieurs interactions auto-inhibitrices empêchent la reconnaissance du promoteur par un σ libre (Borukhov, Res. Microbiol., 2002). A cela vient s'ajouter la présence d'anti-facteur σ (Campbell, Curr. Opin. Microbiol., 2008) et plusieurs régulateurs bactériens qui affectent l'efficacité de l'initiation en interagissant avec la région 4.2 de σ, en renforçant (activateurs) ou en affaiblissant (répresseurs) les interactions de la région 4.2 avec l'élément -35 du promoteur.

B.II)4. La structure de σ^{70}

Comme attendu pour un groupe de protéines ayant des fonctions similaires, l'alignement des séquences de différents facteurs σ a révélé quatre régions d'homologie (Helmann, Annu. Rev. Biochem., 1988 ; Lonetto, J. Bacteriol., 1992). La structure d'un premier fragment de la sous-unité

σ bactérienne a été élucidée en 1996 (Malhotra, Cell, 1996) et son organisation a été rapportée la même année (Severinova, J. Mol. Biol., 1996), puis, la structure de σ^A de *T. aquaticus* a été publiée en 2002 (Campbell, Mol. Cell, 2002)

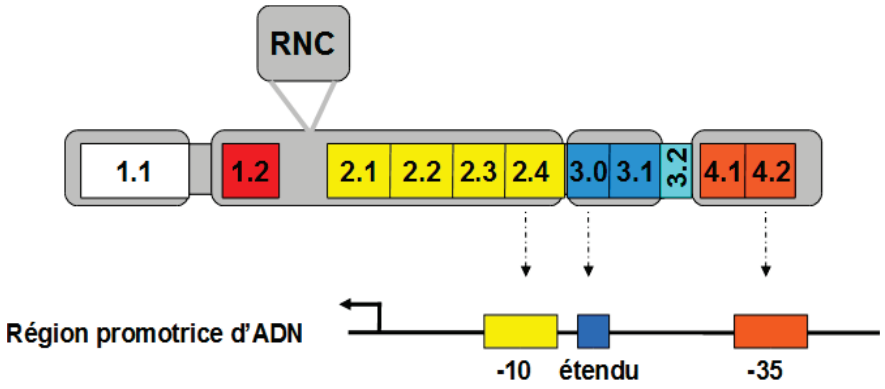


Figure 13 : rôle des régions de σ^{70} dans la reconnaissance des différents éléments du promoteur. RNC : région non conservée.

Les facteurs σ du groupe 1 sont organisés en 4 domaines reliés entre eux par des bras flexibles.

B.II)4.1) Le domaine σ_1

Le premier domaine est constitué de la seule région 1.1. Il s'agit d'un domaine N-terminal constitué d'environ 90 acides aminés qui n'est présent que chez le groupe 1 des facteurs σ. Il est très peu conservé en séquence bien que la caractéristique acide soit préservée. Bien qu'il n'y ait actuellement aucune preuve démontrant qu'il interagisse directement avec le promoteur, il a été démontré que sa présence a un impact majeur sur l'interaction σ^{70}-ADN. Dans un premier temps, il a été suggéré que cette région fonctionnait comme un domaine d'auto-inhibition dans le σ libre, en masquant les déterminants de liaison de l'ADN au promoteur, notamment la région 4.2 (Dombroski , Cell, 1992 ; Dombroski, Genes Dev., 1993 ; Camarero, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002). La région N-terminal de σ^{70}, située entre la région conservée 1.1 et la région conservée 2, empêche la liaison spécifique de l'ADN sans éliminer sa capacité à se lier de façon non spécifique. Les différents σ alternatifs ont tous au moins une partie de la région N-terminal, ils peuvent donc se lier à l'ADN mais sans reconnaître sélectivement le promoteur (Dombroski, Cell, 1992). Des études plus récentes ont montré que dans l'holoenzyme la région 1.1 modulait la formation d'un complexe ouvert lors de l'initiation de la transcription (Wilson, J. Mol. Biol., 1997). Pour un promoteur

donné, la présence de $\sigma_{1.1}$ peut inhiber ou favoriser la formation d'un complexe stable (Vuthoori, J. Mol. Biol., 2001). $\sigma_{1.1}$ masquerait aussi les déterminants de liaison au core situés près de chaque déterminant de liaison à l'ADN. Trois sites de liaison au core ont été identifiés au niveau de la région 1.1. Lors de la liaison de σ^{70} au core, les interactions entre la région 1.1 et les régions 2 et 4 qui masquent les sites de reconnaissance des éléments -10 et -35 des promoteurs sont rompues par des changements de conformation et de nouvelles interactions avec le core se forment (Gruber, Mol. Cell, 2001).

Il n'y a toujours pas de données structurales disponibles sur $\sigma_{1.1}$ puisque ce domaine est absent du σ de *T. aquaticus* utilisé pour la résolution de la structure de l'holoenzyme (Murakami, Science, 2002a) et est désordonné dans la structure obtenue de l'holoenzyme de *T. thermophilus* (Vassylyev, Nature, 2002). Due à sa flexibilité, la structure de la région 1.1 du σ^{70} d'*E. coli* n'a pas encore été déterminée par cristallographie. Une étude montre que dans l'holoenzyme, $\sigma_{1.1}$ chargé négativement serait située à l'intérieur du canal principal de l'ARNP chargé positivement dans la partie du canal accommodant l'ADN aval dans le complexe ouvert. Lors la formation du complexe ouvert, $\sigma_{1.1}$ est déplacé à l'extérieur du canal vers l'extrémité de la pince β, ce qui constitue un déplacement de 51 Å (Mekler, Cell, 2002 ; Kontur, Biochemistry, 2006). Il a aussi été proposé que, du fait de sa sensibilité à la variation de l'espace compris entre les éléments -35 et -10, la région 1.1 pourrait aider l'ARNP à discriminer les régions non promotrices d'ADN et les séquences promotrices spécifiques des facteurs σ alternatifs ne possédant pas cette région (Hook-Barnard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009).

Des études ont montré que la seule présence des régions 1.1 et 2.4 ou 1.2 et 2.4 de σ avec le core était suffisante pour la reconnaissance sélective du brin codant (Severinova, J. Mol. Biol., 1996).

B.II)4.2) Le domaine σ_2

Ce domaine est très conservé et peut être divisé en 5 sous-régions : 1.2, 2.1, 2.2, 2.3 et 2.4. Il s'agit du domaine le plus impliqué dans la liaison de σ au core de l'ARNP grâce à sa structure en U qui s'enroule autour d'une des doubles hélices de β' (540-585) créant ainsi des liaisons multiples. On note également que la face externe de σ_2 interagit avec la partie N-terminale de β' (95-460)

- $\sigma_{1.2}$ (~96-127) est assez bien conservé parmi les facteurs σ des groupes 1 et 2 (Lonetto, J. Bacteriol., 1992), ce qui suggère qu'elle aurait une fonction importante dans l'initiation de la transcription. Elle participerait, avec le motif β' « coiled-coil » du core, à la

modulation allostérique de la reconnaissance de l'élément -10 du promoteur par la région 2.3 de σ (Zenkin, EMBO J., 2007). Cette région pourrait également participer à la formation du complexe ouvert (Wilson, J. Mol. Biol., 1997). Un autre modèle propose que deux acides aminés discriminateurs (Y101 et M102 chez *E. coli*) participeraient à la reconnaissance d'une séquence GGG directement avale à l'élément -10 du promoteur au niveau du brin non matrice (Haugen, Cell, 2006 ; Feklistov, Mol. Cell, 2006 ; Haugen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008).

- $\sigma_{2.1}$ est riche en résidus aromatiques (Helmann, Annu. Rev. Biochem., 1988) et est un déterminant important de la liaison au core (Lesley, Biochemistry, 1989) (Malhotra, Cell, 1996).

- $\sigma_{2.2}$ forme le contact majeur entre σ et le core de l'enzyme en se liant avec le domaine β' « coiled-coil ». Plusieurs mutants de cette région sont incapables de se lier au core (Sharp Genes Dev., 1999 ; Arthur, J. Biol. Chem, 2000) (Joo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997) et empêchent le domaine « coiled-coil » d'induire la liaison à l'ADN (Q406A, E407K) (Young, Cell, 2001).

- $\sigma_{2.3}$ forme une hélice α qui possède 4 résidus aromatiques hautement conservés (F, Y, W) (Helmann, Annu. Rev. Biochem., 1988) qui sortent du corps de la protéine. Ces résidus (F248, Y253 et W256 chez *T. aquaticus* correspondant à Y425, Y430, W433, W434 chez le σ^{70} d'*E. coli*) jouent un rôle essentiel dans la fusion de l'ADN. Cette fusion est induite par la reconnaissance spécifique de l'élément -10 du brin codant (non matrice), ce qui stabilise la bulle de transcription initiale (Marr, Science, 1997 ; Young, Cell, 2001. Des mutations dans la région 2.3 altèrent l'interaction entre σ^{70} et le brin codant (Huang, Nucleic Acids Res., 1997) suggérant que cette région joue aussi un rôle dans la reconnaissance de ce brin, en lien avec sa proximité avec la région 2.4. La liaison spécifique du brin codant stabiliserait la bulle de transcription au niveau du complexe ouvert et rendrait ainsi le brin non codant accessible à la machinerie catalytique (Severinova, J. Mol. Biol, 1996). L'analyse mutationnelle a confirmé que ces résidus aromatiques sont importants pour la formation du complexe ouvert (Panaghie, J. Mol. Biol., 2000).

- $\sigma_{2.4}$ possède 3 résidus hydrophobes conservés (I, L, V) (Helmann, Annu. Rev. Biochem., 1988). Elle reconnait l'élément -10 du promoteur riche en T et en A (TATA box)

sous forme de duplex (Kenney, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989 ; Siegele, J. Mol. Biol., 1989; Daniels, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990 ; Waldburger, J. Mol. Biol., 1990 ; Dombroski, Cell, 1992 ; Dombroski, J. Biol. Chem., 1997) mais est aussi impliquée dans la reconnaissance du brin codant (Marr, Science, 1997). Il contient un suppresseur de mutations allèle-spécifique agissant sur le motif -10 du promoteur (Murakami, Science, 2002b). Chez les facteurs σ du groupe 1, les acides aminés Q260 et N263 (numérotation de *T. aquaticus*, Q437 et T440 chez *E. coli*) suppriment les mutations à la position -12 de l'élément -10 du promoteur (Murakami, Science, 2002b ; Malhotra, Cell, 1996). L'interaction entre le β' « coiled-coil » et la région 2.2 de σ produit un changement allostérique dans la région 2.4 de σ qui permet la liaison sélective du brin codant avec l'élément -10 du promoteur (Young, Cell, 2001).

B.II)4.3) Le domaine σ_3

Ce domaine n'est présent que dans certains facteurs σ (Helmann, Annu. Rev. Biochem., 1988). Il s'agit d'un domaine compact constitué de 3 hélices α (Helmann, Annu. Rev. Biochem., 1988 ; Murakami, Curr. Opin. Struct. Bio., 2003)

- $\sigma_{3.0}$ (anciennement 2.5) reconnaît le motif TG qui constitue le motif -10 étendu sur les promoteurs de cette classe. Ces contacts additionnels se font par l'intermédiaire des résidus H455 et E458 chez *E. coli* et sont assez forts pour rendre les promoteurs de cette classe indépendants de l'interaction entre la région 4.2 de σ et l'élément -35 du promoteur (Barne, EMBO J., 1997; Murakami, Science, 2002a, b). L'interaction avec le promoteur se fait aux environs des positions -17 à -13 (Bown, J. Biol. Chem., 1999).

- $\sigma_{3.1}$ est formée par un motif helix-turn-helix localisé contre la face hydrophobe de la région 3.0 (Campbell, Mol. Cell, 2002). Elle interagit avec la partie C-terminal de la sous-unité β qui comprend les éléments H et I (Gruber, Mol. Cell, 2001). L'analyse mutationnelle a montré que cette région était impliquée dans l'initiation abortive (Hernandez, J. Biol. Chem., 1996).

- $\sigma_{3.2}$ est une région conservée de σ (acides aminés 498-526 chez *E. coli*) chargée négativement qui forme un long domaine de liaison non structuré reliant les domaines de reconnaissance du promoteur. Cette région est constituée en partie d'une boucle en

épingle à cheveux qui avance vers le site actif de l'ARNP et occupe en partie le canal de sortie de l'ARN. D'après ce modèle structural, plusieurs fonctions ont été proposées pour la région 3.2. Il a d'abord été proposé que cette région participe directement à la liaison du nucléotide 5' initiateur (*i*) au site actif (Murakami, Science, 2002a ; Young, Cell, 2002) et dans la stabilisation des transcrits courts (Zenkin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004). Kulbachinskiy *et al.* (Kulbachinskiy, J. Biol. Chem., 2006) ont proposé que la région 3.2 était impliquée non pas dans la liaison de la partie 5' du premier nucléotide au site *i* mais du deuxième nucléotide au site *i+1*. De plus, de part sa localisation, la boucle de la région 3.2 bloque stériquement la sortie de l'ARN d'une taille ≥ 5 nt (Murakami, Science, 2002a). Au cours de l'étape d'initiation, lors du début de la synthèse du transcrit, soit celui-ci peut déplacer la boucle 3.2 pour s'engager dans le canal de sortie de l'ARN, ce qui favorise la dissociation du facteur σ et la poursuite de la transcription avec l'étape d'élongation, soit il ne peut pas déplacer la boucle, se dissocie lui-même du complexe et forme un produit abortif. Il y a donc compétition directe entre la boucle 3.2 et le transcrit ARN, et cela peut être une raison majeure de l'initiation abortive (Mekler, Cell, 2002 ; Kulbachinskiy, J. Biol. Chem., 2006). Il a aussi été proposé que le déplacement de la boucle 3.2 lors du passage de l'ARN dans le canal de sortie de l'ARN participait, en rompant certaines interactions entre la sous-unité σ et le core de l'enzyme, à l'étape d'échappement de σ, c'est-à-dire à sa dissociation du core (Murakami, Science, 2002a ; Young, Cell, 2002 ; Vassylyev, Nature, 2002 ; Murakami, Curr. Opin. Struct. Biol., 2003).

B.II)4.4) Le domaine σ_4

- **σ4:** ce domaine (acides aminés 340-423 chez *E. coli*) a une forme en C, avec une poche concave ayant en surface les résidus hydrophobes de $\sigma_{4.1}$ (Murakami, Science, 2002).

  - $\sigma_{4.1}$ possède plusieurs résidus hydrophobes. La mutation de certains de ces résidus entraine la perte de liaison au core de l'ARNP, suggérant que cette région jouerait un rôle dans la liaison core-σ (Sharp, Genes Dev., 1999). Cette région pourrait aussi interagir avec certains éléments activateurs de la transcription au cours de l'initiation. Elle est contactée par le domaine β' ZBD au niveau de l'extrémité C-terminal de sa seconde hélice ce qui pourrait aider le positionnement de la région 4 sur le domaine β

« flap » (Vassylyev, Nature, 2002 ; Geszvain, J. Mol. Biol., 2004).

- $\sigma_{4.2}$ contacte l'élément -35 du promoteur grâce au motif conservé Helix-Turn-Helix et établit ainsi la première interaction entre le facteur σ et l'ADN permettant la reconnaissance spécifique de l'élément -35 (Siegele, J. Mol. Biol., 1989 ; Gardella, J. Mol. Biol., 1989).

B.II)5. La liaison de la sous-unité σ au core : formation de l'holoenzyme

De nombreux changements de conformation interviennent au niveau du core de l'enzyme et de la sous-unité σ lors de leur liaison.

Au niveau du core, les changements de conformation se produisent au niveau des sous-unités β et β'. Les domaines β' « clamp » et β « lobe » se dirigent vers le site actif, réduisant le diamètre du canal principal de 27 Å à 10 Å. La liaison du domaine 4 avec le core induit une rotation de l'extrémité de l'hélice « flap » de 15° vers le site actif. Le domaine β « flap » réduit la largeur du canal de sortie de l'ARN. Le domaine « protrusion » s'éloigne du canal principal de 10 Å et les domaines β' ZBD, « lid » et « zipper », désordonnés dans le core, se structurent.

Les quatre domaines de σ interagissent de façon extensive avec le core (Sharp, Genes Dev., 1999) mais aucune interaction n'a été établie avec les domaines αNTD et αCTD (Gruber, Mol. Cell, 2001). Dans la sous-unité σ libre, le domaine 1.1 empêcherait la reconnaissance du promoteur en masquant les sites de reconnaissance (Dombroski, Cell, 1992 ; Dombroski, Genes Dev., 1993) mais également en masquant les domaines de liaison au core (Gruber, Mol. Cell, 2001). Lors de la formation de l'holoenzyme, le changement de conformation subit par ce domaine le positionnerait à l'intérieur du canal principal et lèverait l'auto-inhibition. Le domaine 2 de σ interagit avec le domaine β' « clamp » du core en formant une structure en forme de U. Il a d'ailleurs été montré que le principal contact entre σ et le core se faisait par l'intermédiaire de la région 2.2 de σ et du domaine β' « coiled-coil » (segment B de β' 260-309 chez *E. coli*). Leur liaison entrainerait un changement allostérique au niveau de la région 2.4 permettant sa liaison à l'ADN. La région 2.1 serait un déterminant important de la liaison au core et pourrait aussi contacter le domaine « coiled-coil ». La région 2.3 jouerait un rôle dans la fusion de l'ADN, il est donc dirigé vers le canal principal. La région 2.4 responsable de la reconnaissance de l'élément -10 du promoteur est elle aussi dirigée vers le canal principal. Le domaine 3 se trouve au niveau du site actif et contacterait la région de la sous-unité β située près de ce site. La région 3.2 est profondément enfoncée dans le

canal principal. Une partie de cette région interagit avec les domaines β' « zipper », « rudder » et « lid » alors que l'extrémité de la boucle se dirige vers le site actif à une distance d'environ 25 Å et qu'une autre partie bloque l'entrée du canal de sortie de l'ARN. Le domaine 4 interagit avec le domaine β « flap» et est localisé à la surface du core, à proximité du canal de sortie de l'ARN, et le bloque. La région 4.1 est contactée par le domaine β'ZBD. Le motif Helix-Turn-Helix de la région 4.2 est dirigé vers le canal principal et permet la reconnaissance de l'élément -35 du promoteur. Ceci constitue la première interaction formée entre la sous-unité σ et le promoteur (Murakami, Science, 2002b ; Vassylyev, Nature, 2002 ; Geszvain, www.bact.wisc.edu/landick).

C. Les étapes du cycle transcriptionnel

Le cycle transcriptionnel se décompose en trois étapes qui sont l'initiation, l'élongation et la terminaison. Le cycle commence avec la liaison de l'ARNP au promoteur et se termine par le relargage du brin transcrit.

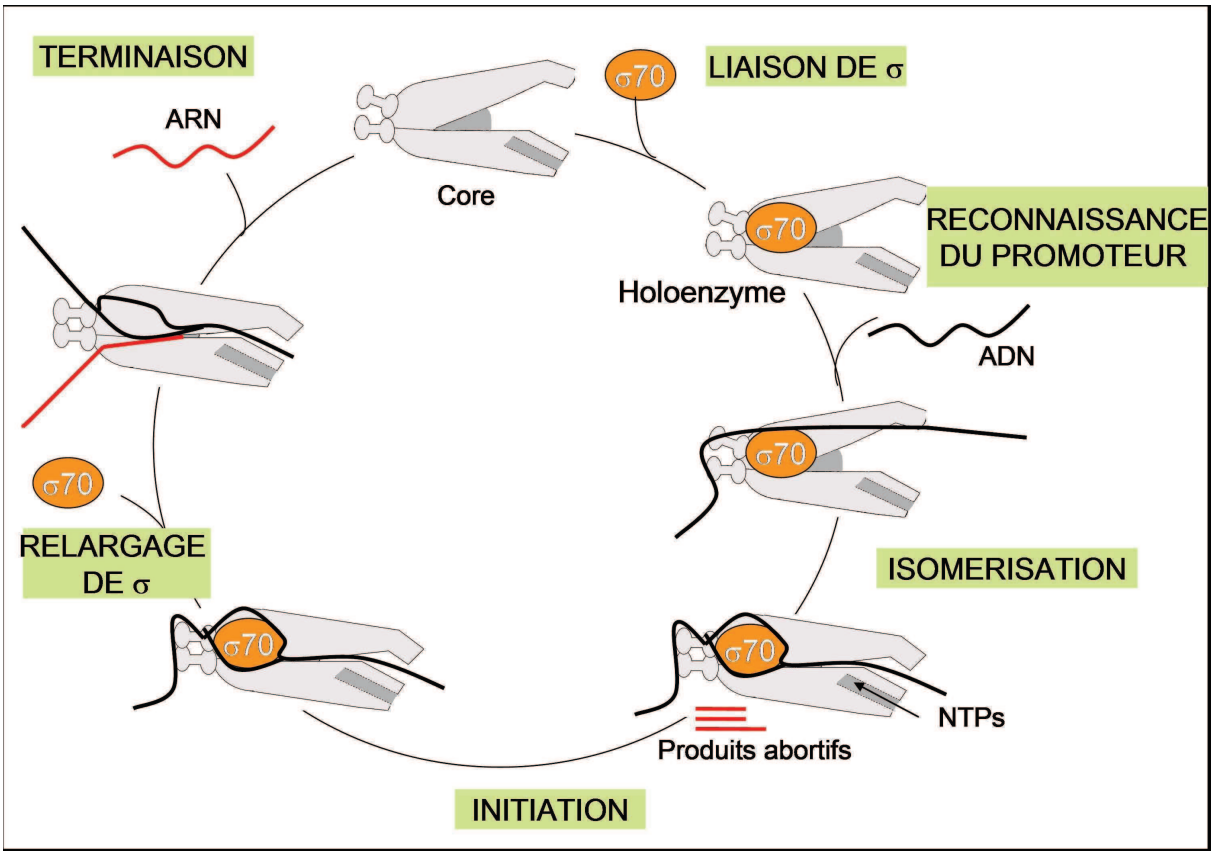


Figure 14 : Les différentes étapes du cycle transcriptionnel.

C.I) L'initiation

C.I)1. La formation du complexe fermé

Lors de la formation du complexe fermé, pour les promoteurs de type -35 -10, les régions 2.4 et 4.2 de σ reconnaissent respectivement les éléments -10 et -35 du promoteur. Pour les promoteurs à UP élément tels que T7A1 ou *rrnB* P1, le premier intermédiaire observé correspond à

la liaison du domaine αCTD à l'élément UP du promoteur, impliquant la protection de cet élément au clivage par les radicaux hydroxyls et un réarrangement du domaine αCTD (Rogozina, Nucleic Acids Res., 2009 ; Ross, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005). Cette protection se fait de façon asymétrique sur les deux brins. Une autre protection a été observée et correspondrait à la liaison de l'ADN au domaine Zn-finger (Rogozina, Nucleic Acids Res., 2009). C'est aussi à cette étape que se fait la liaison de la région 4.2 de σ à l'élément -35. L'interaction du motif Helix-Turn-Helix de la région 4.2 avec le sillon principal de l'ADN au niveau de l'élément -35 induit la formation d'une courbure de l'ADN de 36° (Murakami, Science, 2002a, b ; Campbell, Mol. Cell, 2002). Cette déformation permettrait la reconnaissance de l'élément -10 du promoteur par la région 2.4 de σ, impossible en conformation droite avec un espacement de 17 pb entre les deux éléments (Vassylyev, Nature, 2002). Elle permettrait aussi l'interaction avec des régulateurs se fixant en amont de l'élément -35. Pour les promoteurs à motif -10 étendu, deux résidus (H455 et E458 chez *E. coli*) de la région 3.0 de σ reconnaissent le motif -16 TG en amont de l'élément -10 (Barne, EMBO J., 1997). Dans le complexe fermé, l'ADN se trouve à l'extérieur du canal principal comme l'indique l'absence de protection à la DNase I constatée au niveau de l'ADN en aval de la position -6 (Saecker, J. Mol. Biol., 2002). A cette étape, la région 1.1 de σ est située dans la partie avale du canal primaire et la région 3.2 obstrue le canal de sortie de l'ARN.

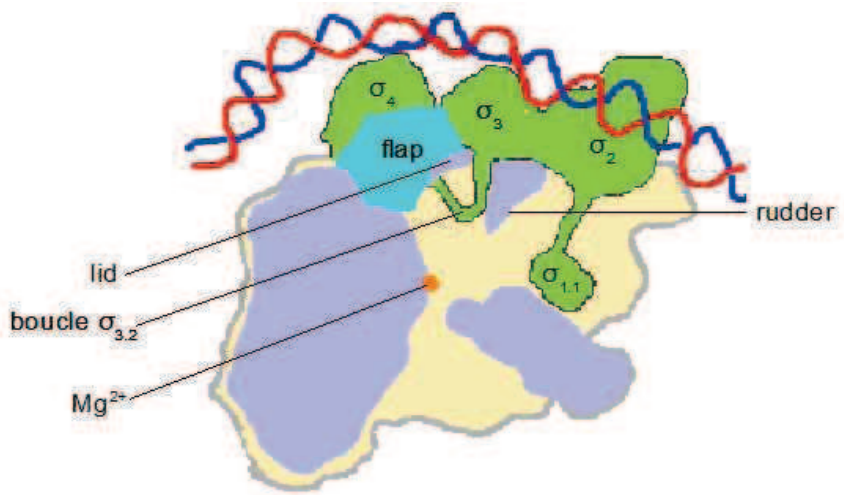


Figure 15 : Représentation schématique du complexe fermé.

C.I)2. Les différents types d'éléments de promoteur reconnus par les facteurs σ.

Il existe plusieurs éléments au niveau de la séquence promotrice de l'ADN qui déterminent la spécificité de liaison d'un facteur σ à un promoteur, la force de la liaison et l'efficacité d'un

promoteur donné :

- **-10 -35 :** Ces promoteurs sont formés de deux hexamères centrés vers les positions -35 et -10 en amont du site +1 marquant le début de la transcription. Les séquences consensus de ces deux régions sont respectivement TTGACA et TATAAT sur le brin non codant. Généralement, il y a une bonne corrélation entre l'homologie des séquences hexamériques avec leurs séquences consensus, la force de l'interaction avec le facteur σ et la force du promoteur. La variation de séquence dans ces deux éléments constitue donc un facteur déterminant la force du promoteur (Busby, Cell, 1994 ; Browning, Nat. Rev. Microbiol., 2004). La distance entre les deux hexamères -35 et -10 peut elle aussi varier. La distance consensus entre ces deux éléments est de 17 pb. Il a été montré que les promoteurs dont la distance entre les deux hexamères est de 17 pb sont plus efficaces *in vitro* et *in vivo* que les promoteurs dont l'espacement est plus court ou plus long (Mulligan, J. Biol. Chem., 1985 ; Ayers, J. Mol. Biol., 1989). La position conservée -11A au niveau du brin non matrice, qui constitue la partie avale de la bulle de transcription (Li, J. Biol. Chem., 1998), est particulièrement importante pour la nucléation du promoteur lors de la formation du complexe ouvert (Heyduk, J. Biol. Chem., 2006).

- **-10 étendu :** Ces promoteurs ne possèdent pas d'élément -35 identifiable mais un élément -10 plus étendu avec la présence de deux nucléotides supplémentaires TG séparés de l'élément -10 par un seul nucléotide. La séquence consensus de ce type de promoteur est donc TGNTATAAT. La formation du complexe ouvert sur ce type de promoteur semble être moins dépendante de la température que pour des promoteurs possédant un élément -35 (Minchin, Biochem. J., 1993). La région 3.0 de σ^{70} est responsable de la reconnaissance de la séquence TG de cet élément (Barne, EMBO J., 1997). Cette interaction semble favoriser la transcription en augmentant la fréquence d'association et en stabilisant le complexe (Camacho, J. Mol. Biol., 1999 ; Voskuil, J. Mol. Biol. 2002). Ce type de promoteur est peu présent chez *E. coli* mais plus fréquent chez *B. subtilis* (Camacho, J. Mol. Biol., 1999 ; Voskuil, J. Mol. Biol. 2002). Un exemple de promoteur -10 étendu chez *E. coli* est *gal*P1.

- **Elément UP :** il est présent chez des promoteurs contenant les éléments -10 et -35 et un troisième élément, l'élément UP, situé en amont de l'hexamère -35. L'élément UP le mieux caractérisé est celui du promoteur *rrnB* P1. Riche en adénine (A) et en thymine

(T), il est localisé approximativement entre -40 et -60. La séquence consensus est -59 nnAAA(A/T)(A/T)T(A/T)TTTTnnAAAAnnn -38 (Estrem, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998). Le promoteur semi-synthétique *lac*UV5 fait partie de cette famille de promoteurs, de même que le promoteur T7A1. Ces deux promoteurs ont des séquences très proches, ils diffèrent essentiellement par l'espacement entre les éléments -35 et -10 (18 pb pour *lac*UV5 et 17 pb pour T7A1).

- **Elément discriminateur :** il s'agit d'une séquence conservée de 7 pb, riche en GC, dont la séquence consensus est CGCCNC, localisée en aval de l'élément -10 du promoteur (Travers, J. Bacteriol., 1980). Cet élément serait responsable de l'instabilité des complexes formés par les promoteurs d'ARNr et d'ARNt et de leur sensibilité à la réponse stringente médiée par (p)ppGpp (Pemberton, J. Mol. Biol., 2000 ; Lamond, Cell, 1985). Cette séquence serait donc importante pour la régulation de l'expression de ces promoteurs. Au niveau de cette séquence le motif optimal GGG, localisé sur le brin non matrice, est reconnu par la région 1.2 de σ^{70} (Haugen, Cell, 2006 ; Feklistov, Mol. Cell, 2006 ; Haugen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008).

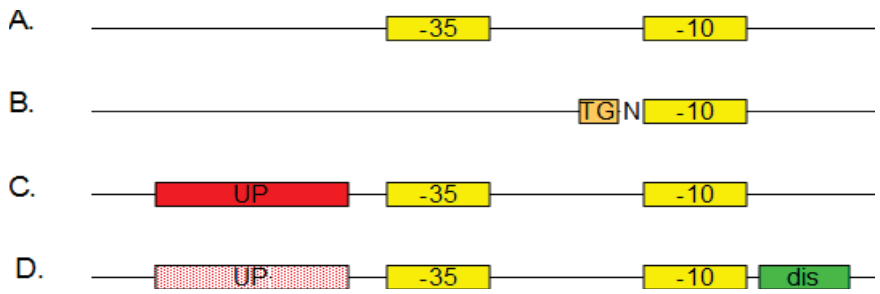


Figure 16 : Les différents types de promoteurs reconnus par les facteurs σ. A. Promoteur -10 -35. B. Promoteur -10 étendu. C. Promoteur à élément UP. D. Promoteurs comportant un élément discriminateur. Certains de ces promoteurs possèdent un élément UP.

La contribution de chaque élément diffère selon les promoteurs. Des déficiences dans un élément peuvent être compensées par un autre. En l'état actuel des connaissances, il n'existe pas de promoteur possédant de versions parfaites de tous ces éléments. Un tel promoteur lierait trop fortement l'ARNP pour permettre la transcription. La différence d'affinité entre chaque promoteur est un élément permettant la régulation de la transcription (Browning, Nat. Rev. Microbiol., 2004).

C.I)3. Les étapes intermédiaires

C.I)3.1) Le passage de RPc à RPi

La formation d'un complexe ouvert stable compétent pour la transcription implique une succession précise d'étapes couplée à des changements de conformation importants au niveau de l'ARNP. Selon le promoteur plusieurs complexes intermédiaires peuvent être formés de façon séquentielle avant le complexe ouvert. Pour les promoteurs λP_R et *lac*UV5 les différents intermédiaires sont les suivants:

*lac*UV5 : R + P ⇆ RPc ⇆ RPi→RPo

λP_R : R + P ⇆ I_1 ⇆ I_2 → RPo

Les différents intermédiaires peuvent être thermodynamiquement et structurellement distincts en fonction du promoteur. Par exemple, le complexe fermé (RPc) formé pour le promoteur semi-synthétique *lac*UV5 correspond à l'intermédiaire I_1 pour le promoteur de phage λP_R. La formation de RPc (ou I_1 pour λP_R) se fait de façon rapide alors que la conversion à I_1 (ou I_2 pour λP_R) se fait de façon lente. RPc est sensible aux compétiteurs tels que l'héparine alors que RPo et I_2 sont résistants. La formation des différents intermédiaires conduisant à la formation du complexe ouvert est dépendante de la température et un équilibre se forme entre ces différents intermédiaires plus ou moins stables. On peut classer ces différentes étapes en deux phases: une phase rapide correspondant à la formation des contacts entre l'ARNP et l'ADN pour les premiers intermédiaires formés et une phase lente correspondant à la formation d'un complexe ouvert stable. Chacune des ces étapes est réversible et constitue un site de régulation potentiel de la transcription.

C.I)3.2) Isomérisation du promoteur

Pour le promoteur *lac*UV5 il y a un équilibre rapide qui se forme entre la dissociation en RPc et l'isomérisation en RPi. Les interactions entre l'ADN et l'ARNP, faibles dans le complexe fermé deviennent plus fortes dans le complexe intermédiaire. En effet, on observe une courbure de l'ADN de l'ordre de 90° au niveau de l'élément -10 du promoteur lui permettant d'interagir avec la région 2 de σ et qui induit le positionnement de la partie avale de l'ADN vers l'entrée de sillon formé par les sous-unités β et β'. Cette courbure serait centrée aux alentours de bases -11/-12 et serait induite par la région 2 de σ^{70}.

C.I)3.3) Ouverture du promoteur.

La distorsion de l'ADN au niveau de l'élément -10 du promoteur induirait une plus grande flexibilité de l'ADN et le positionnerait à proximité des résidus aromatiques de la région 2.3 de σ qui interagit avec le brin non matrice, stabilisant le cours fragment fusionné et formant la partie avale de la bulle de transcription (Murakami, Curr. Opin. Struct. Biol., 2003). Cette étape se produit en dehors du canal principal. ILa formation de contacts stables entre la région 2.3 de σ et l'ADN simple brin au niveau de l'élément -10 induirait des changements de conformation du domaine β' « coiled-coil » transmis à d'autres domaines et pourrait aboutir à l'ouverture du canal principal, permettant ainsi l'entrée de l'ADN en aval de l'élément -10. Il a été proposé que l'ouverture du promoteur pourrait faire intervenir un mécanisme de 'scrunching' dans lequel l'ARNP tire l'ADN aval en amont, ce qui aboutirait à son ouverture de manière séquentielle, comme pour une fermeture éclair (Chen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010).

C.I)3.4) Entrée de l'ADN dans le canal principal.

Lors de l'ouverture du promoteur, l'ADN aval se lie aux domaines β' « jaw » et β « lobe » en aval du site actif. Cette liaison entraîne de profonds remaniements conformationnels, notamment au niveau des éléments « switch », conduisant à l'ouverture du « clamp » (Wigneshweraraj, EMBO J., 2004). Cette ouverture est accompagnée par l'éjection de la région 1.1 de σ^{70} du canal principal qui le maintenait ouvert, permettant la pénétration de l'ADN double brin aval dans le canal principal (Mekler, Cell, 2002 ; Kontur, Biochemistry, 2006).

Deux modèles ont été proposés pour expliquer l'entrée de l'ADN aval (positions -5 à +25) dans le canal principal. Dans le premier modèle, supporté par des expériences de footprint et de crosslink effectuées sur les promoteurs *lac*UV5, T7A1, λPR et *gro*E (Cowing, J. Mol. Biol., 1989 ; Schickor, EMBO J., 1990 ; Studitsky, Nuleic Acids Res., 2001 ; Gries, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010), l'ADN est courbé à un angle de 90° au niveau de la région 2 de σ puis est capturé par les pinces de l'ARNP. Dans ce modèle l'ouverture du promoteur ne s'effectue qu'une fois que les interactions entre l'ADN et le canal sont formées. Dans le second modèle, basé sur des expériences de footprint en temps réel utilisant le promoteur T7A1 (Rogozina, Nucleic Acids Res., 2009) et sur des simulations de dynamique Brownienne par ordinateur (Chen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010), la fusion de l'ADN précède son entrée dans le canal. Ces deux modèles sont apparemment

contradictoires mais les différences observées pourraient être expliquées par la dépendance de la séquence des évènements conduisant à l'ouverture d'un promoteur au type de promoteur utilisé.

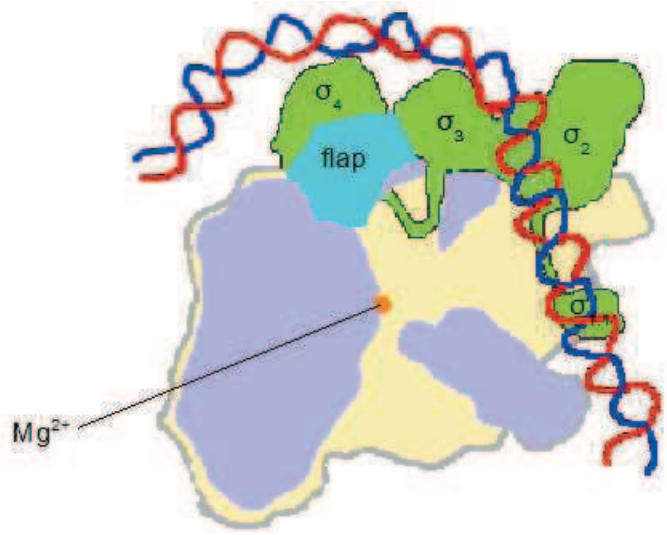


Figure 17 : Représentation schématique du positionnement de l'ADN au niveau du canal principal lors des étapes intermédiaires.

C.I)4. La formation du complexe ouvert

Des interactions instables, formées entre l'ARNP et l'ADN, induisent des changements de conformation supplémentaires au niveau du site actif et des pinces en aval du site actif qui réorientent l'ADN. La fusion de l'ADN s'étend au-delà de la position +1, formant une bulle de transcription. Le domaine « trigger loop » situé en aval du site actif, interagit avec l'ADN de la position +1 à +3 correspondant à une extrémité de la bulle de transcription qui s'étend sur environ 14 pb. Ce domaine empêche la pénétration de l'ADN double brin plus avant dans le canal et le maintiendrait en position ouverte (Vassylyev, Nature, 2002). Le brin matrice est dirigé vers le site actif et passe par un tunnel chargé positivement, formé des domaines 2 et 3 de σ et des domaines β « protrusion », β' « lid » et β' « rudder » (Murakami, Science, 2002b), alors que le brin non matrice est maintenu entre les domaines « lobe » et « protrusion » (Naryshkin, Cell, 2000). Les résidus basiques des régions 2.4 et 3.0 de σ pourraient jouer un rôle dans le guidage du brin matrice vers le site actif. La partie avale de l'ADN double brin (environ 15 pb) est maintenue dans le canal en aval du site actif entre les pinces de l'ARNP formées par les domaines β' « jaw » et β « lobe » et joue un rôle important dans la stabilité du complexe en renforçant la fermeture du canal autour de l'ADN.

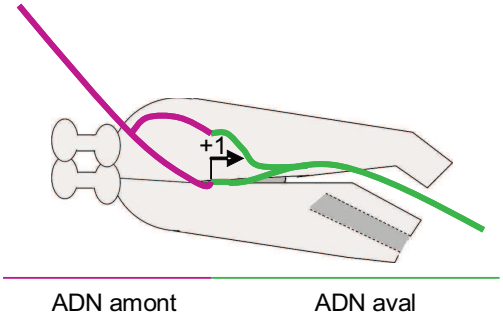


Figure 18 : Représentation schématique du positionnement de l'ADN amont et de l'ADN aval lors de la formation du complexe ouvert.

C.I)5. L'initiation abortive

Le positionnement du nucléotide + 1 de l'ADN au niveau du site actif, conjointement à l'arrivée des NTPs par le canal secondaire, permet l'initiation de la transcription. Elle débute par la formation de la première liaison phosphodiester entre deux NTPs complémentaires au brin matrice et positionnés au niveau des sites *i* et *i+1* du site actif. Il a été proposé que la boucle de la région 3.2 de σ contribuait à la stabilisation du NTP initiateur en interagissant avec son phosphate γ, facilitant ainsi sa liaison au site *i* (Severinov, J. Biol. Chem., 1994) alors qu'une autre étude propose qu'il agirait sur la liaison du deuxième nucléotide au site *i+1* (Kulbachinskiy, J. Biol. Chem., 2006). Lors de la phase abortive, l'ARNP synthétise des fragments d'ARN qui, lorsqu'ils atteignent une longueur de 2 à 9 nt sont relâchés, indiquant que la transcription ne peut pas aller plus loin. Cela est dû à la position de $\sigma_{3.2}$ au niveau du canal de sortie de l'ARN (Vassylyev, Nature, 2002 ; Murakami, Science, 2002a), bloquant le passage du brin naissant dans ce canal. Le conflit entre cette boucle et l'ARN se produirait à partir d'une longueur du brin de 6 nt (Murakami, Science, 2002a). Les interactions avec le transcrit seraient déstabilisées, conduisant au relâchement du brin d'ARN. Afin de continuer sa synthèse, le brin d'ARN devra déplacer la boucle 3.2 de σ. La délétion de cette boucle 3.2 conduit à la formation de transcrits abortifs de 8-16 nt (Kulbachinskiy, J. Biol. Chem., 2006). Ces données sont en corrélation avec le modèle proposé où la région 4 de σ, liée au domaine β « flap », forme une barrière empêchant le passage de l'ARN dans le canal de sortie de l'ARN au-delà de 16 nt (Vassylyev, Nature, 2002 ; Nickels, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005). L'ARN transcrit devra donc également déplacer cette barrière afin de former un complexe d'élongation stable. Pendant l'initiation abortive l'ARNP recommence le cycle d'initiation sur le promoteur plusieurs fois sans se détacher du brin matrice (Carpousis, Biochemistry, 1980).

Lors du passage du complexe ouvert l'ARNP tire l'ADN aval 1 pb en amont formant une protubérance au niveau de la région fusionnée dans un phénomène appelé « scrunching ». Le « scrunching » provoque un stress qui peut être résolu de deux manières. Soit en relâchant l'ADN lors de l'initiation abortive soit en brisant les interactions avec le promoteur, provoquant la translocation et la formation d'un complexe productif (Kapanidis, Science, 2006 ; Revyakin, Science, 2006).

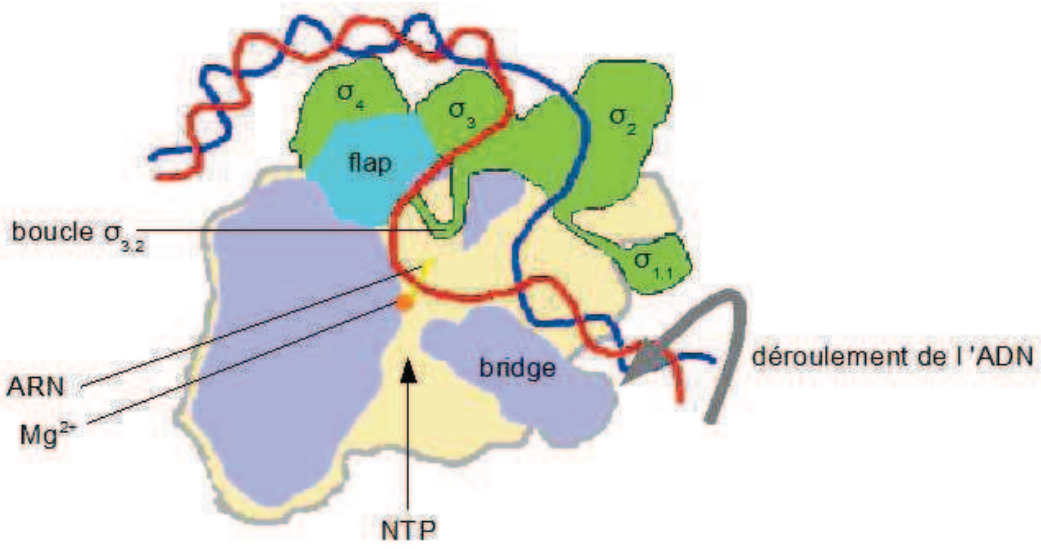


Figure 19 : Représentation schématique de l'étape d'initiation abortive.

C.I)6. La transition entre l'initiation abortive et l'élongation

Des changements d'interaction inconnus permettent à l'ARN d'une longueur de 11 nt de déplacer complètement la boucle 3.2 de σ et d'entrer dans le canal de sortie de l'ARN. Cela induirait la déstabilisation des interactions entre la région 4 de σ et le domaine β « flap », provoquant la déstabilisation des interactions entre la région 4 de σ et l'élément -35 du promoteur. Ces transitions constituent la première étape du relargage de σ et permettent la translocation de l'ARN le long du brin d'ADN, nécessaire pour continuer la transcription. La transition de l'étape d'initiation abortive à l'élongation ne nécessite pas la séparation complète du facteur σ avec le core de l'ARNP (Bar-Nahum, Cell, 2001 ; Mukhopadhyay, Cell, 2001 ; Reppas, Mol. Cell, 2006). En effet, sur certains types de promoteurs comme λP_R et *lac*UV5, σ^{70} a été impliqué dans la formation de complexe d'élongation en pause (Ring, Cell, 1996 ; Brodolin, Nat. Struct. Mol. Biol., 2004).

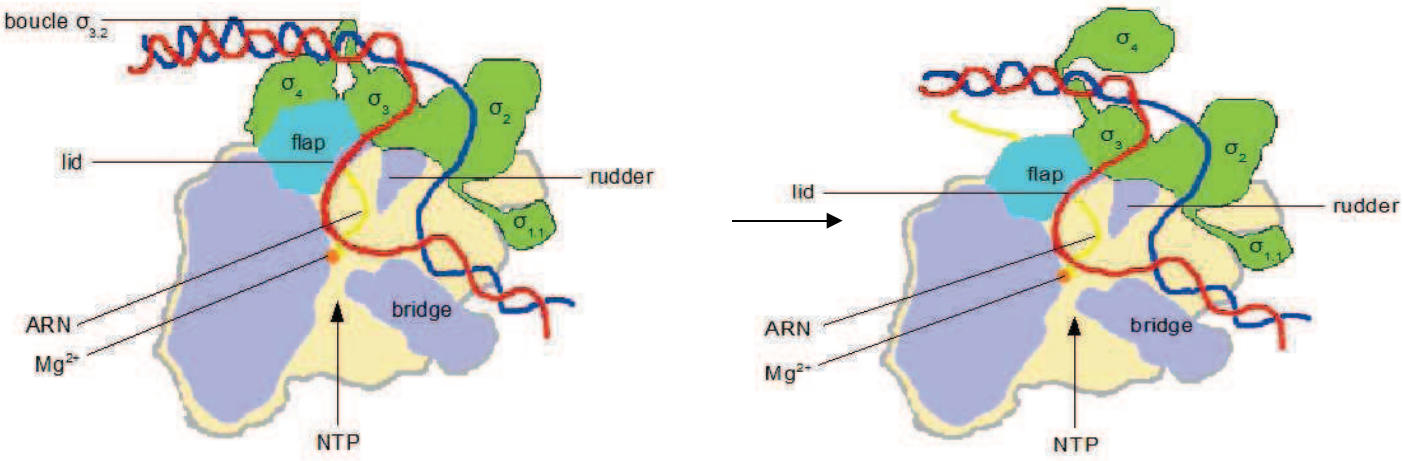


Figure 20 : Représentation schématique de l'étape de relargage du facteur σ.

C.II) L'élongation

L'étape d'élongation commence une fois que l'ARNP s'est séparée du promoteur et que la liaison du facteur σ au core de l'enzyme a été fragilisée ou que celui-ci a été dissocié. Le complexe d'élongation transcriptionnel (TEC) est extrêmement stable est processif, avec une vitesse de transcription comprise entre 10 et 35 nt/s *in vitro* et entre 50 et 100 nt/s *in vivo* (Uptain, Annu. Rev. Biochem., 1997).

C.II)1. La structure du complexe d'élongation

La résolution de la structure du complexe d'élongation montre que la partie avale entrante de l'ADN et la partie amont sortante forment un angle de 92° (Rees, Science, 1993). Environ 35 pb d'ADN sont protégées de la digestion par la DNase I ou du clivage aux radicaux hydroxyls, définissant la portion comprise dans le canal primaire. 15 à 20 pb de cette portion en aval du site actif sont enserrées entre les pinces de l'ARNP. Au moins 9 pb d'ADN double brin en aval sont nécessaires à la stabilité du TEC (Nudler, Science, 1996). Une bulle de transcription d'environ 14 nt entoure le site actif et permet l'accès au brin matrice. Sur ces 14 nt 8-9 nt forment un hybride avec l'ARN naissant (Nudler, Cell, 1997 ; Komissarova, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998). Les 3-4 nt non hybridés à l'ARN en amont du site actif peuvent interagir avec le domaine « rudder » et sont re-hybridées avec le brin non matrice. Le brin non matrice est séparé du brin matrice dans la bulle de

transcription par les domaines β « lobe » et β « protrusion ». L'hybride ARN/ADN ne peut pas dépasser la taille de 8-9 pb car il est contraint en aval par l'ion Mg^{2+} et en amont par les domaines β' « rudder », β' « lid », β' « zipper » et β « flap ». Cet hybride contribue en partie à la stabilité du TEC. Une fois que le transcrit a atteint une taille d'environ 9 nt il est dissocié du brin matrice et entre dans le canal de sortie de l'ARN. Dans le canal de sortie de l'ARN le transcrit est protégé du clivage hydroxy-radical jusqu'à une taille d'environ 14 nt avant de sortir du TEC (Komissarova, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998).

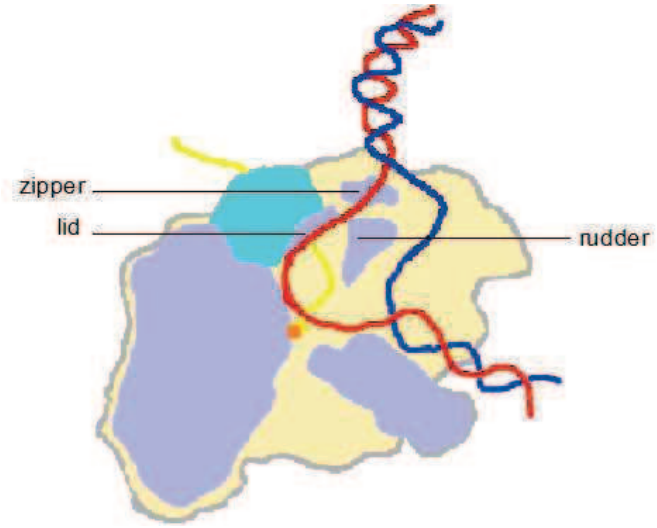


Figure 21 : Représentation schématique de l'étape d'élongation.

C.II)2. La progression de l'ADN et de l'ARN dans le TEC au cours de la transcription

L'ADN double brin entre dans l'ARNP par le canal formé entre les domaines β' « jaw » et β « lobe » en aval du site actif. Environ 15 à 20 pb sont sous cette forme d'hybride. Au delà, l'ADN est fusionné sur environ 14 nt avec l'extrémité amont de la bulle maintenue par les domaines β' « lid » et β' « zipper », le brin non matrice étant séparé du brin matrice par les domaines β « lobe » et β « protrusion ». En amont de la bulle de transcription, l'ADN se réhybride est forme un angle de 92°C par rapport à l'ADN double brin en aval. La bulle de transcription entoure le site actif qui ajoute les NTPs complémentaires à la séquence du brin matrice localisée au site *i+1*. A chaque addition de NTP le complexe est transloqué d'un nucléotide en aval afin de permettre la liaison du nucléotide suivant. Cette séquence d'addition de nucléotides forme un hybride ARN/ADN de 8-9 pb

au-delà duquel les brins matrice et non matrice sont réhybridés. Ces 8-9 nt d'ARN se détachent du promoteur pour entrer dans le canal de sortie de l'ARN. Un mouvement du domaine β « flap » permet l'entrée de l'ARN dans le canal dans lequel il continue à s'allonger jusqu'à environ 14 nt avant d'en sortir (Korzheva, Science, 2000).

C.II)3. Le cycle d'addition des nucléotides

Comme décrit précédemment le site catalytique est caractérisé par la présence de deux ions Mg^{2+} I et Mg^{2+} II. Le NTP constituant l'extrémité 3' du brin d'ARN est localisé au site *i*, le NTP entrant se positionne au site *i+1*, proche de Mg^{2+} I. L'ion Mg^{2+} II participe au positionnement correct du NTP entrant au niveau du site actif en étant lié au NTP par les β, γ-phosphates du ribose de celui-ci. D'autres résidus hautement conservés de la sous-unité β' (N458, E925 et Q929 chez *E. coli*) sont impliqués dans la stabilisation du NTP entrant (Sosunov, EMBO J., 2003).

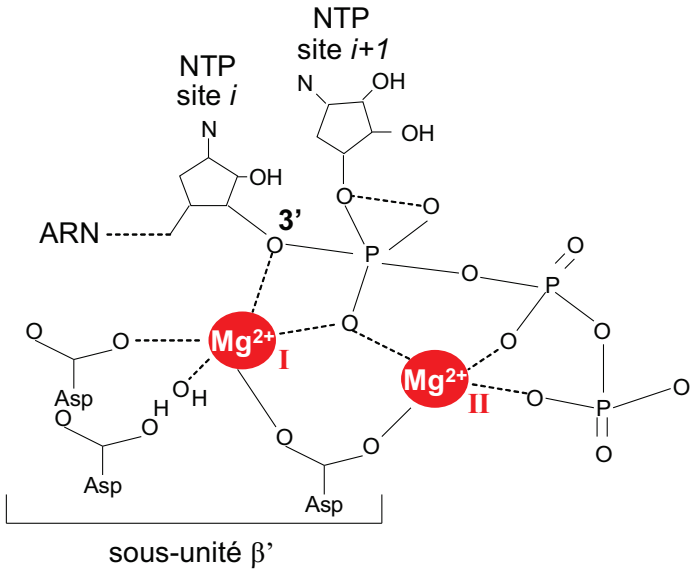


Figure 22 : Schématisation des interactions présentes au niveau du site actif entre les deux ions Mg^{2+}, la sous-unité β' et l'ARN.

Le domaine « bridge helix » en conformation droite et le domaine « trigger loop » pourraient également être impliqués (Vassylyev, Nature, 2007). Lorsque le NTP entrant est correctement orienté, une attaque nucléophile S_N2 se produit entre le groupement 3' OH du brin d'ARN et l' α-phosphate du NTP entrant, formant une liaison phosphodiester. Cette liaison conduit à la formation et au relargage de pyrophosphate (PPi) lors de la transition du NTP entrant libre au NMP lié au brin d'ARN. Ce phénomène s'appelle la pyrophosphorolyse. Une fois la liaison phosphodiester formée,

il y a translocation du TEC le long de l'ADN d'une paire de base en aval afin de positionner la nouvelle extrémité 3'-OH du brin d'ARN en position *i* et de permettre l'insertion d'un nouvel NTP au site *i+1*. Cette translocation se ferait par l'intermédiaire d'un changement de conformation de droite à coudée du domaine « bridge helix » qui dirigerait l'extrémité 3'-OH du transcrit vers le site *i*, et de la conformation « trigger loop » à « trigger helix » qui favorisait l'ouverture des pinces aval de l'ARNP (Vassylyev, Nature, 2007).

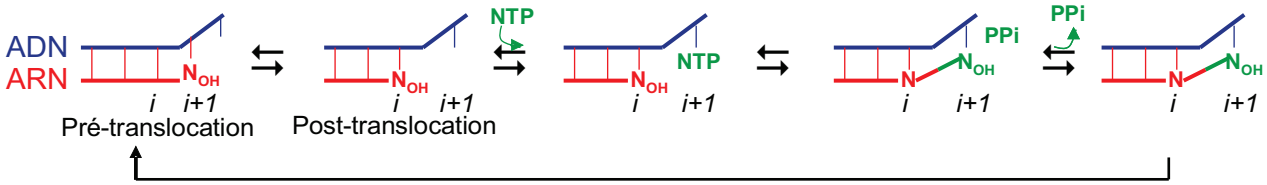


Figure 23 : Schématisation des différentes étapes impliquées dans le cycle d'addition des nucléotides.

C.II)4. Le maintient de la fidélité de la transcription

Le site actif est capable de détecter les mésappariements de NTPs et de discriminer entre les ribonucléotides et les deoxyribonucléotides. L'insertion dans le brin ARN naissant de dNTP ou d'un NTP non complémentaire à la séquence ADN déformerait l'hybride ADN/ARN et diminuerait sa stabilité provoquant le retour en arrière de l'ARNP (backtracking) sur l'hybride jusqu'à une position en aval du NTP mal apparié, le positionnant près du canal secondaire. Cette position serait alors clivée par les facteurs Gre A/B liés à l'entrée de ce canal (Polyakov, J. Mol. Biol., 1998).

C.III) La terminaison

La terminaison de la transcription intervient en fonction de deux signaux. Soit par un signal de terminaison intrinsèque qui conduit à la formation d'un ARN en épingle à cheveux. Soit par l'intervention de protéines régulatrices de terminaison telles que le facteur Rho.

C.III)1. La terminaison indépendante du facteur Rho

Le signal de terminaison intrinsèque est défini par une séquence palindromique riche en GC immédiatement suivie par au moins quatre thymines qui résultera en un ARN ayant une structure en pince à cheveux, fusionnée à une répétition d'uridine dans sa partie 3' (Platt, Annu. Rev. Biochem., 1986 ; Brendel, J. Biomol. Struct. Dyn., 1986). Le motif uridine induirait la pause du complexe d'élongation, permettant à la structure en pince à cheveux de se former et inactivant le TEC (Gusarov, Mol. Cell, 1999). Les domaines β « flap », β' « zipper » et « zinc finger » pourraient jouer le rôle de chaperonnes dans la nucléation de la structure en pince à cheveux et dans sa stabilisation. Quand le motif en pince à cheveux atteint une taille de 4-5 pb il commence à se diriger vers le canal principal et à se dissocier de l'hybride. Lorsqu'il atteint une taille de 7-8 pb il contacte le domaine « trigger loop » localisé dans le canal principal. Ce contact induit le changement de conformation du domaine « trigger loop » en conformation « trigger helix » le dirigeant vers l'extrémité 3' de l'ARN. Le domaine « trigger loop » est à la fois impliqué dans la terminaison dépendante et dans la terminaison indépendante d'un site de pause (Epshtein, Mol. Cell, 2007). Le domaine « trigger loop » participerait à toutes les étapes de la terminaison : le contrôle du phénomène de pause induit par le motif uridine (Bar-Nahum, Cell, 2005), l'interaction directe avec la structure en épingle à cheveux, l'inactivation et la dissociation du TEC. Le changement conformationnel du domaine « trigger loop », pourrait induire le mouvement d'autres domaines adjacents et résulter à l'ouverture du « clamp », rompant les interactions formées entre l'ADN et l'ARNP. L'ADN et l'ARN seraient alors relâchés. Selon ce modèle, la terminaison n'implique pas la translocation de l'ARNP (Epshtein, Mol. Cell, 2007).

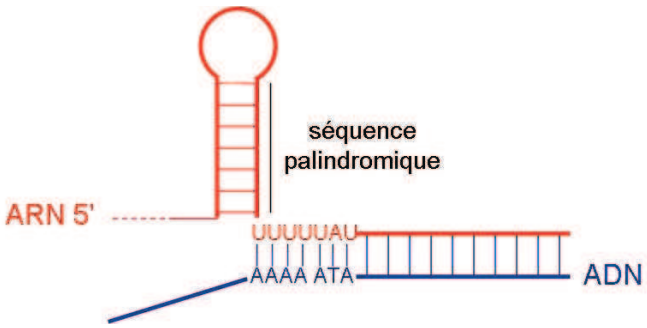


Figure 24 : structure de l'ARN en épingle à cheveux constituant le signal de terminaison.

C.III)2. La terminaison dépendante du facteur Rho (revue: Ciampi, Microbiology, 2006)

Environ la moitié des séquences de terminaison identifiées chez *E. coli* sont dépendantes du

facteur Rho. Le facteur Rho est une protéine homohexamerique qui se lie à l'ARN et qui possède des activités ATPase et hélicase. Chacun des monomères de Rho possède deux domaines, un petit domaine N-terminal et un plus gros domaine C-terminal. Le domaine N-terminal est responsable de la reconnaissance de l'ARN par le facteur Rho alors que le domaine C-terminal est nécessaire à la translocation du facteur et au déroulement de l'hybride ARN/ADN (Dombroski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988). Les sites de liaison au facteur Rho, appelés sites d'utilisation de Rho (*rut*), sont riches en C et pauvres en G. La liaison du facteur Rho à l'ARN induit des changements de conformation libérant son activité ARN-ADN hélicase 5'→3' dépendante de l'ATP. La liaison de l'ATP au facteur Rho induit d'autres changements de conformation lui permettant d'hydrolyser l'ATP. L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire à la translocation de 5'→3' du facteur Rho le long de l'ARN jusqu'au TEC arrêté au site de pause. Au niveau de ces sites, l'activité 5'→ 3' hélicase du facteur Rho dissocie l'ARN du complexe de transcription.

Même si le facteur Rho est la plupart du temps suffisant pour conduire la terminaison *in vitro*, *in vivo* d'autres co-facteurs peuvent être nécessaires. Les protéines NusA, NusB et NusG sont d'autres facteurs participant à la terminaison. NusG connecterait le facteur Rho au TEC, favorisant la reconnaissance des signaux de terminaison mais permettrait aussi à l'ARNP d'être plus sensible à l'action de Rho en augmentant le taux de relargage des transcrits (Burns, J. Biol. Chem., 1999), mais augmente aussi le taux d'élongation. NusA se lie aussi au facteur Rho et à l'ARNP et aussi un facteur d'élongation, mais contrairement à NusG elle la ralentie en favorisant l'arrêt de l'ARNP sur certains sites de pause (Artsimovitch, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000) et pourrait donc contribuer à la terminaison en réduisant le taux d'élongation.

C.IV) Rôle du couple DksA/(p)ppGpp dans la régulation de la transcription

La protéine DksA, ppGpp et les NTPs interagissent pour réguler la synthèse des ARNr chez *E. coli*.

C.IV)1. DksA

DksA est un facteur de transcription de 17 kDa. Des études biochimiques et ses similarités structurales avec les facteurs d'élongation GreA et GreB suggèrent que la protéine se lie eu niveau du canal secondaire de l'ARNP, mais la structure du complexe DksA-ARNP n'a pas encore été

résolue (Potrykus, Annu. Rev. Microbiol., 2008 ; Rutherford, Genes Dev., 2009). DksA n'interagit pas directement avec l'ADN, en conséquence, sa liaison à l'ARNP diminue la durée de vie des complexes formés par tous les promoteurs. Cependant, la protéine n'affecte directement la transcription que de certains promoteurs car son effet dépend aussi des propriétés cinétiques intrinsèques des promoteurs. Et, contrairement à la plupart des promoteurs, le complexe ouvert (RPo) des promoteurs ribosomaux a une très courte durée de vie. Pour ces promoteurs, DksA va diriger l'équilibre RPc (complexe fermé) ⇆ RPi (complexe intermédiaire) dans le sens de la dissociation (RPc). DksA ne déstabilise pas RPc. Pour se faire, DksA induit des changements de conformation au niveau de l'ARNP et de l'ADN pendant la transition de RPc à RPi (Rutherford, Genes Dev., 2009). Les éléments « switch », et les domaines « bridge helix » et « trigger loop » jouent un rôle essentiel dans la déstabilisation de RPi. En effet, le site de liaison de DksA est localisé à 25 à 40 Å des interactions ARNP-ADN en aval de l'élément -10 du promoteur dans RPi, ce qui indique que l'effet de DksA est allostérique. Or, L'extrémité « coiled-coil » de DksA se trouve près des domaines « trigger loop » et « bridge helix ». La protéine pourrait donc interagir directement avec ces domaines et causer des changements de conformation qui déstabiliseraient les interactions ARNP-ADN. Des études mutationnelles ont montré que ces domaines, ainsi que les éléments « switch », notamment « switch-3 », sont nécessaires à la fonction de DksA, renforçant l'hypothèse d'un effet allostérique (Rutherford, Genes Dev., 2009).

C.IV)2. (p)ppGpp

ppGpp et pppGpp ((p)ppGpp) sont des dérivés de GTP et GDP et constituent un signal de stress nutritif qui entraine des changement dans l'expression génique chez la plupart des bactéries et chez les plantes. Les gènes *rsh* (ou leurs variants selon les espèces) sont responsables de la synthèse de (p)ppGpp par l'intermédiaire des protéines RSH (RelA et SpoT chez *E. coli*). Les protéines RSH possèdent des fonctions synthase et hydrolase. Or, RelA ne possède que la fonction synthase, elle est donc considérée comme une protéine spécialisée dans la synthèse de (p)ppGpp. Lorsqu'il y a carence en acides aminés RelA s'associe aux ribosomes et la liaison des ARNt non chargés au site ribosomal A arrête la synthèse protéique et induit la synthèse de (p)ppGpp par RelA. La protéine SpoT possède une activité synthase limitée et une activité hydrolase permettant l'hydrolyse de (p)ppGpp en GDP/GTP et pyrophosphate. Une forte activité synthase entraine l'augmentation importante du taux de (p)ppGpp ce qui provoque une réponse stringente, inhibe la croissance des bactéries et, chez *E. coli,* entraîne la variation de l'expression génique afin d'arrêter les activités

inutiles chez les bactéries en phase stationnaire. La concentration en (p)ppGpp est donc inversement proportionnelle à la croissance cellulaire (Potrykus, Annu. Rev. Microbiol., 2008 ; Srivatsan, Curr. Opin. Microbiol., 2008). Il est admis de manière consensuelle que le déterminant de la croissance cellulaire serait (p)ppGpp plutôt que la concentration en NTPs. (p)ppGpp a de nombreuses actions sur les cellules. Ses effets sont complexes et varient selon les organismes. Il est admis que la molécule exerce une action sur le métabolisme et la physiologie de la cellule, sur la réplication de l'ADN, sur la transcription des ARNr, des ARNt et de certains ARNm, sur la traduction, et est importante pour l'induction de la virulence et de la persistance. (p)ppGpp permet de changer le métabolisme de la cellule presque instantanément en réponse aux variations de l'environnement (Potrykus, Annu. Rev. Microbiol., 2008 ; Magnusson, Trends Microbiol., 2005 ; Srivatsan, Curr. Opin. Microbiol., 2008). Le site de liaison de ppGpp sur l'ARNP est un point litigieux or, sa résolution contribuerait grandement à la compréhension de son mécanisme d'action. La structure du complexe ARNP-ppGpp a été déterminée par cristallographie aux rayons X en 2004 chez *T. thermophilus* (Artsimovitch, Cell, 2004). Elle localise le site de liaison au niveau du canal secondaire et, adjacent au site actif. Or, cette localisation contredit les résultats d'expériences de mutation, de cross-link et de quenching de fluorescence (Tedin, J. Biol. Chem., 1992 ; Reddy, Mol. Microbiol., 1995 ; Chatterji, Genes Cells, 1998 ; Toulokhonov, J. Biol. Chem, 2001) menées sur l'ARNP de *E. coli*. Le site de liaison identifié chez *T. thermophilus* pourrait être différent de celui de *E. coli*. Cette différence pourrait s'expliquer par l'absence de sous-unité ω dans les ARNPs préparées pour les études mutationnelles chez *E. coli* et pour tester la pertinence du site de liaison résolu chez *T. thermophilus*. Or, les ARNPs ne comportant pas la sous-unité ω ne sont pas inhibés par ppGpp *in vitro*. De plus, le site de liaison déterminé chez *T. thermpohilus* peut accommoder plusieurs molécules de charge négative, ppGpp peut lier cette poche dans deux orientations différentes, le site chevauche le site de liaison des NTPs et de la tagetitoxine. Ces différentes données indiquent que ppGpp pourrait occuper une poche de liaison de charge positive dans le co-cristal qui serait différente de celle significative du point de vue physiologique dans la régulation de la transcription. Enfin, des mutations au niveau des résidus d'*E. coli* homologues à ceux constituant le site de liaison chez *T. thermophilus* n'affectent pas la réponse de l'ARNP à ppGpp, ppGpp n'inhibe pas l'initiation de la transcription chez *T. thermophilus*, et aucune compétition n'a été trouvée entre la molécule et les NTPs (Vrentas, J. Mol. Biol., 2008). L'effet de (p)ppGpp *in vitro* n'a pas la même efficacité que *in vivo.* Cela est du à la dépendance de (p)ppGpp à DksA *in vivo* pour la transcription des promoteurs des ribosomiques et de synthèses des acides aminés.

C.IV)3. Effet synergique de DksA et de (p)ppGpp

ppGpp seul n'a pas ou peu d'effet sur le RPi et, lorsque la concentration de DksA est haute ppGpp n'exerce pas d'effet additionnel. Par contre, lorsque la concentration en DksA n'est pas saturante ppGpp et DksA agissent de façon synergique et directe sur la stabilité des complexes ouverts (Rutherford, Genes Dev., 2009). DksA possède deux résidus acides à l'extrémité d'une structure en forme de doigt qui stabiliserait la liaison de ppGpp à l'ARNP par coordination mutuelle d'un ion Mg^{2+} (Potrykus, Annu. Rev. Microbiol., 2008). La modification directe de l'ARNP par DksA est nécessaire afin de changer la concentration en ppGpp et en NTPs et avoir un effet sur le complexe d'initiation de la transcription (Rutherford, Genes Dev., 2009). Le couple DksA/ (p)ppGpp défavorise la stabilité des complexes ouverts de tous les promoteurs mais leur effet sur la transcription dépend en partie des propriétés cinétiques intrinsèques des promoteurs (Haugen, Nat. Rev. Microbiol., 2008). Les complexes intrinsèquement instables sont davantage déstabilisés et l'initiation de la transcription est inhibée. Les promoteurs à ARNr possèdent une séquence discriminatrice reconnue par la région 1.2 de σ riche en GC et une séquence d'écartement de 16 pb (différente de la longueur consensus de 17 pb). Ces promoteurs forment des complexes ouverts très instables et sont donc régulés négativement. Contrairement aux promoteurs des ARNr, les promoteurs de synthèse des acides aminés possèdent un discriminateur riche en AT qui favorise une liaison optimale de la région 1.2 de σ ainsi qu'une séquence d'écartement de 18 pb. Les complexes ouverts formés par ces promoteurs sont assez stables pour résister aux effets de (p)ppGpp. De plus, le couple DksA/(p)ppGpp augmente le taux de formation de ces complexes ouverts, stimulant l'initiation de la transcription au niveau de ces promoteurs (Srivatsan, Curr. Opin. Microbiol., 2008).

(p)ppGpp/DksA peut également affecter la transcription de manière indirecte en altérant l'utilisant des facteurs σ dans le sens des gènes dépendants de σ alternatifs. Ce mécanisme impliquerait deux modèles de compétition où (p)ppGpp/DksA augmenteraient la disponibilité de l'ARNP libre en inhibant les promoteurs forts dépendants de σ^{70} et augmenteraient également la disponibilité du core en perturbant l'interaction core-σ^{70} (Srivatsan, Curr. Opin. Microbiol., 2008 ; Potrykus, Annu. Rev. Microbiol., 2008).

En conclusion, l'analyse en microarray a montré que la reprogrammation transcriptionnelle en situation de stress nutritif implique plusieurs centaines de gènes et la plupart de ces changements dans l'expression génique peuvent être expliqués par les interactions entre l'ARNP, les promoteurs, (p)ppGpp, DksA et les facteurs σ.

D. Les inhibiteurs de l'ARN polymérase

Bien que la rifampicine et ses dérivés soient les seuls inhibiteurs de l'ARNP en usage clinique, de nombreuses molécules ont été décrites comme ciblant cette enzyme indispensable aux fonctions essentielles des bactéries. L'éventail des composés décrits à ce jour comprend des produits naturels et, plus récemment, des molécules synthétiques. Les progrès réalisés dans les techniques d'études structurales ont permis de résoudre la structure des complexes ARNP/inhibiteur, de visualiser les interactions formées dans ces complexes, de définir le site de liaison et de déterminer le mode d'action des molécules inhibitrices. La meilleure compréhension des interactions entre les inhibiteurs et leur cible a ouvert la voie à la synthèse de composés plus efficaces qui présenteraient les qualités requises pour être utilisés en clinique. Les molécules décrites ci-dessous présentent une grande diversité dans leur taille, leur structure et leur site de liaison. Cette diversité se traduit par des mécanismes d'action variés touchant la plupart des étapes de transcription.

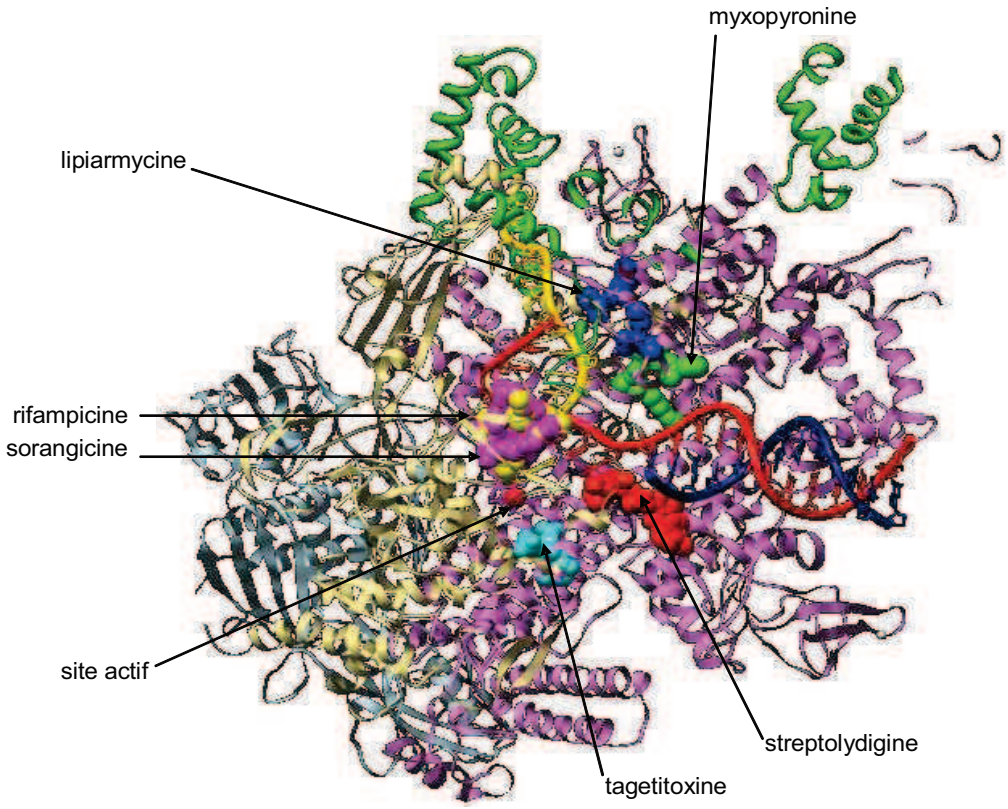


Figure 25 : Structure des complexes antibiotiques/ARNP obtenus par cristallisation et modélisation du site de liaison de la lipiarmycine à partir des mutations obtenues.

D.I) Les molécules ciblant le canal principal de l'ARN polymérase

Le canal principal de l'ARNP est la cible de nombreux inhibiteurs. Ceux-ci sont généralement localisés à proximité du site actif et interfèrent avec lui de manière directe ou allostérique.

D.I)1. Les ansamycines

Les ansamycines constituent une large famille composée de molécules macrocycliques isolées à partir d'une souche d'*Amycolatopsis mediterranei* (anciennement appelée *Streptomyces mediterranei* puis *Nocardia mediterranei*) (Oppolzer, Experientia, 1964). Le nom ansamycine a été donné en 1973 par Prelog et Oppolzer (Prelog, Helv. Chim. Acta., 1973) à une série de dérivés qui possèdent un noyau aromatique (chromophore) et une chaîne aliphatique fixée de part et d'autre du noyau aromatique. Deux groupes de molécules sont différenciés au sein de la famille des ansamycines :

- les ansamycines de type naphtalène qui inhibent spécifiquement la transcription bactérienne (rifamycines, halomicine, streptovaricines, tolypomycines, naphtomycines, awamycine et ansathiazine).
- et les ansamycines du type benzénique qui possèdent des activités antifongiques et antitumorales.

Les rifamycines ont été isolés en 1957 par Sensi *et al.* (Sensi, Antibiot. Annu., 1959-1960) à partir d'une souche de *Nocardia mediterranei*. Les rifamycines se caractérisent par une chaîne aliphatique fixée en position 2 du noyau naphatalène et en position 12 de ce même noyau. La rifamycine B est le principal dérivé, mais, malgré une bonne activité inhibitrice sur l'ADN polymérase isolée, elle est bactériologiquement peu active à cause de son incapacité à franchir la paroi bactérienne. La rifamycine B est convertie en deux composés : les rifamycines O et S qui sont eux actifs sur les bactéries. La rifamycine S peut être réduite en rifamycine SV qui est le premier médicament de cette classe chimique introduit sur le marché en 1962 pour le traitement des infections bactériennes Gram-positives et de la tuberculose. La rifampicine est l'antibiotique de référence de cette famille et constitue toujours le traitement de première ligne contre la tuberculose. Il fait parti des antibiotiques les plus actifs que l'on connaisse. Malheureusement, la haute capacité de la molécule à générer des mutants résistants (la fréquence de mutations spontanées des bactéries résistantes à la rifampicine atteint 10^{-7}) limite sérieusement son utilisation thérapeutique. Les mutations de l'ARNP n'expliquent pas à elles seules les résistances observées chez les différentes bactéries ciblées par la rifampicine. Les différents mécanismes de résistance sont exposés dans l'**article n°1**. Des dérivés de la rifampicine sont également commercialisés : la rifapentine et la

rifabutine. D'autres molécules sont en essai clinique comme la rifalazil (Activbiotics Pharm), qui possède une longue demi-vie dans le plasma et les tissus (Mae, Xenobiotica, 1998), pour le traitement d'infections dues à des Chlamydia persistantes (Rothstein, Arch. Pharm., 2007). La rifamixine (Salix Pharmaceuticals) possède une activité contre un large spectre d'entéropathogènes et n'est pas absorbable, deux caractéristiques la rendant particulièrement adaptée dans le traitement de certaines diarrhées infectieuses et notamment celles dues à *Clostridium difficile*. Elle a d'ailleurs été approuvée par la FDA pour cet usage et pour la réduction du risque d'encéphalopathie hépatique (Cottreau, Expert Rev. Anti. Infect. Ther., 2010).

La résolution récente de la structure du complexe entre le core de l'ARNP de *T. aquaticus* et la rifampicine a permis de déterminer que la rifampicine se fixe dans une poche de β localisée au niveau du canal principal et que douze acides aminés (Campbell, Cell, 2001) sont impliqués dans la liaison de cette molécule. La rifampicine interagit seulement avec la sous-unité β, ce qui est en accord avec des résultats précédents montrant que les mutations conférant des résistances à la rifampicine sont localisées au niveau du gène *rpoB*. De plus, les douze acides aminés, à l'exception d'un seul, génèrent des phénotypes de résistance à la rifampicine après mutation.

Des études biochimiques (Mustaev, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994) et la résolution de la structure cristallographique du complexe core-rifampicine indiquent que la rifampicine est localisée à 15 Å du site actif. Il en a été déduit que la rifampicine agirait directement en bloquant la synthèse de l'ARN transcrit au-delà de 2-3 nt par occlusion du canal. Ce modèle est le plus communément admis mais d'autres études viennent le tempérer. Une étude de 1978 (McClure, J. Biol. Chem., 1978) a montré que la première liaison phosphodiester était inhibée par la rifampicine. Une autre étude (Wegrzyn, FEBS Lett., 1998) a rapporté que l'inhibition de la transcription par la rifampicine avait une dépendance au facteur σ car l'holoenzyme portant σ^{70} était plus sensible à l'effet de la rifampicine que l'holoenzyme portant σ^{32}. Cependant, il faut noter que les conclusions de cette étude ont été faites à partir d'une expérience comparant l'effet de la rifampicine, en présence de σ^{70} et de σ^{32}, sur la transcription de deux promoteurs différents. Il est donc difficile de déterminer si la différence observée est due à la différence de structure entre les deux σ ou à la différence entre les deux promoteurs (P_L et groE). Ces résultats corrèlent avec la structure cristallographique du complexe RNAP/holoenzyme rapportée en 2005 (Artsimovitch, Cell, 2005). Cette structure montre que la rifampicine serait plus proche de l'élément « hairpin loop » de la région 3 de σ que prédit par le structure du complexe core/rifampicine (Campbell, Cell, 2001), ce qui pourrait expliquer la dépendance au facteur σ observée dans l'étude de Wegrzyn *et al.* (Wegrzyn, FEBS Lett., 1998). Dans ce modèle, la liaison de la rifampicine à l'ARNP changerait la conformation de la région 3 de σ et induirait la propagation d'un effet allostérique le long de l'ADN vers le site actif. La liaison de

l'ion catalytique serait ainsi défavorisée, entrainant la dissociation de fragments courts d'ARN transcrit. Ce modèle d'effet allostérique a été contesté par Feklistov *et al.* en 2008 (Feklistov, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008).

D.I)2. La streptolydigine

La streptolydigine est un antibiotique du groupe des acyl tétramiques produit par *Streptomyces lydigus* et isolé en 1955 (Deboer, Antibiot. Annu., 1955-1956 ; Crum, Antibiot. Annu., 1955-1956 ; Lewis, Antibiot. Annu., 1955-1956). Il est également connu sous le nom de portamycine. Cette molécule possède une activité à large spectre sur les bactéries à Gram-positif mais ne peut généralement pas passer à travers les membranes des bactéries à Gram-négatif, à l'exception de *Pasteurella multocida* (De Boer, Patent, 1964). Elle bloquerait les étapes d'initiation, d'élongation et de pyrophosphorolyse et l'étape de translocation (Siddhikol, J. Bacteriol., 1969 ; Cassani, Nat. New Biol., 1971 ; McClure, J. Biol. Chem., 1980 ; Tuske, Cell, 2005). Par contre, elle n'agit pas sur les ARNP I, II et III eucaryotes. Les mutations conférant une résistance à la streptolydigine sont localisées aux acides aminés 543-546 et 570-571 de la sous-unité β de l'ARNP de *E. coli* (Heisler, J. Biol. Chem., 1993 ; Tuske, Cell, 2005), et 788, 791, 792, 793, 798, 926, 930, 931, 937, 940, 1136, 1139, 1146 de la sous-unité β' (Severinov, J. Biol. Chem., 1995 ; Tuske, Cell, 2005). Les mutations localisées au niveau de la sous-unité β sont proches d'autres mutations conférant une résistance à la rifampicine. Cependant, la liaison de la streptolydigine à l'ARNP n'a aucun effet sur la liaison de la rifampicine, indiquant que les molécules ont deux sites de fixation distincts. Ils ne présentent d'ailleurs qu'une résistance croisée minime (Xu, J. Bacteriol., 2005). De même pour d'autres inhibiteurs de l'ARNP tels que la microcine J25 (Yuzenkova, J. Biol. Chem., 2002 ; Adelman, Mol. Cell, 2004 ; Mukhopadhyay, Mol. Cell, 2004), la sorangicine (Campbell, EMBO J., 2005) et CBR703 (Artsimovitch, Science, 2003). Les déterminants sont localisés au niveau de trois domaines structuraux de l'ARNP : un défini comme la « poche » de la streptolydigine, le domaine « bridge helix », et le domaine « trigger loop ». Ces trois domaines définissent un site situé proche du site actif mais qui ne le chevauche pas. Par contre, la localisation du site de liaison de la septolydigine qui est proche de celui de la microcine J25, se traduit par une liaison exclusive des deux molécules (Tuske, Cell, 2005). La structure de la molécule en complexe avec l'ARNP de *T. thermophilus* a été déterminée en 2005 (Tuske, Cell, 2005 ; Temiakov, Mol. Cell, 2005). Elle confirme que la streptolydigine interagit avec les éléments « bridge helix » et « trigger loop » et qu'elle n'est pas positionnée pour interagir directement avec la liaison phosphodiester,

étant située à 20 Å du site actif. La liaison de la molécule à son site actif provoque des changements de conformation au niveau des domaines « trigger loop » et « bridge helix », empêchant le cycle de changement conformationnel du domaine « bridge helix » et par conséquent le cycle d'addition des nucléotides (Tuske, Cell, 2005). Le deuxième mécanisme d'action proposé implique que la streptolydigine bloque le transfert des NTPs du site de pré-insertion (*i*) au site d'insertion (*i+1*) (Temiakov, Mol. Cell, 2005 ; Kyzer, Cell, 2005).

D.I)3. Les sorangicines (Irschik, J. Antibiot., 1987)

Les sorangicines font partie d'une des nombreuses familles de composés produits par les myxobactéries (corralopyronines, ripostatines, myxopyronines, etc.). Elles ont été isolées en 1987. Il s'agit de macrolides polyether produits par la souche *Sorangium (Polyangium) cellulosum* So cel2 et présents sous deux formes structurales : sorangicine A et B, la sorangicine A étant le composé majoritaire. Cette molécule est principalement active contre les bactéries à Gram-positif, y compris les myocobactéries, avec des valeurs de CMI entre 0,01 et 0,1 µg/mL. Mais de plus fortes concentrations (~30µg/mL) inhibent aussi les bactéries à Gram-négatif. Les levures et les champignons sont eux complètement résistants à cet antibiotique. Dès la première étude, il a été déterminé que la sorangicine bloquait l'activité de l'ARNP des eubactéries lorsqu'elle était ajoutée avant que la réaction de transcription ait commencée, ce qui suggère qu'elle agit lors de l'initiation de la transcription (Irschik, J. Antibiot., 1987). Chez *E. coli* et *S. aureus* il y a une résistance croisée partielle entre la rifampicine et la sorangicine (Römmele, J. Antibiot., 1990 ; Campbell, EMBO J., 2005 ; O'Neill, Antimicrob. Agents Chemoter., 2000 ; Xu, J. Bacteriol., 2005). Un effet différentiel a été observé selon le déterminant muté. Les mutants ont ainsi été répartis en trois classes. (i) La plupart des mutants Rif^R sont aussi Sor^R avec un niveau de résistance comparable. Ils constituent la première classe de mutants. (ii) Certaines mutations conférant un haut niveau de résistance pour la rifampicine ne confèrent qu'une résistance moyenne à la sorangicine. Ces mutants forment la deuxième classe. (iii) Deux substitutions ne confèrent qu'une résistance moyenne à faible pour la rifampicine mais une forte résistance à la sorangicine. Ils constituent la troisième classe de mutants. La structure du complexe entre l'ARNP de *T. aquaticus* et la sorangicine a été résolue par cristallisation aux rayons-X. Couplée aux expériences de résistance croisée, elle révèle que la sorangicine occupe la même poche de liaison que la rifampicine au niveau de la sous-unité β de l'ARNP, avec un chevauchement presque parfait des déterminants de liaison. De fait, la liaison de la sorangicine et de la rifampicine à l'ARNP sont mutuellement exclusives (Xu, J. Bacteriol., 2005).

Des expériences de transcription ont montré que la sorangicine avait le même mécanisme d'action que la rifampicine et la même efficacité *in vitro*, ce qui corrèle avec les données structurales. Du fait de sa localisation, celle-ci bloquerait donc la synthèse du brin ARN à une longueur de 2-3 nt. A la différence de la rifampicine, la sorangicine est aussi efficace sur l'ARNP de *T. aquaticus* que sur celle d'*E. coli*. Il a aussi été rapporté qu'elle était moins sensible que la rifampicine aux substitutions d'acides aminés au niveau de son site de liaison qui entrainent des changements de structure. Or, il a été montré que la structure de la sorangicine lui conférait une plus grande flexibilité intrinsèque que la rifampicine (Campbell, EMBO J., 2005). Cette flexibilité pourrait donc expliquer la différence de sensibilité entre les deux molécules. Il serait intéressant d'exploiter ces résultats afin de permettre la synthèse d'antibiotiques moins sensibles à la mutation rapide de leur cible.

D.I)4. La série CBR703 (Artismovitch, Science, 2003)

La série CBR703 constitue la première classe d'inhibiteurs synthétiques de l'ARNP. Ils ont été isolés grâce au criblage d'une librairie de composés visant à trouver des inhibiteurs de l'ARNP d'*E. coli*. Des variants plus actifs, dont CBR9379 ont été synthétisés à partir du progéniteur CBR703. L'isolation de mutants résistants à CBR703 à partir d'*E. coli tolC* montre que les mutations sont organisées en « clusters » vers le milieu des gènes *rpoB* et *rpoC*. Des tests de transcription confirment que l'ARNP bactérienne est la cible de ce composé et de ses dérivés mais que l'ARNP II humaine n'est pas inhibée. Ces molécules n'inhibent pas la formation du complexe promoteur/ARNP, ne dissocient pas le complexe d'élongation et n'affectent pas la translocation de l'ADN et de l'ARN. Par contre, elles inhibent toutes les réactions catalytiques connues de l'ARNP : la liaison des nucléotides, la pyrophosphorolyse et le clivage hydrolytique de l'ARN en formation au niveau du site actif. Les mutations conférant une résistance au CBR703 indiquent que la molécule se lie à l'ARNP au niveau d'un sillon à la surface de l'enzyme, à la jonction entre le domaine β' « bridge helix » et la sous-unité β. Cette localisation en surface suggère un effet allostérique de la molécule. Il a donc été proposé que l'interaction de l'antibiotique avec le domaine flexible « bridge helix » empêchait ce domaine d'adopter la conformation requise pour l'ajout des nucléotides au niveau du site actif. CBR703 et son dérivé plus actif CBR64 sont particulièrement prometteurs pour un usage clinique car ils sont actifs contre les bactéries persistantes. En effet, une étude a montré qu'ils réduisent la population bactérienne des biofilms de *Staphylococcus epidermidis* de 3 $\log_{10}$ à une concentration de 4x CMI (Villain-Guillot, Antimicrob. Agents Chemother., 2007).

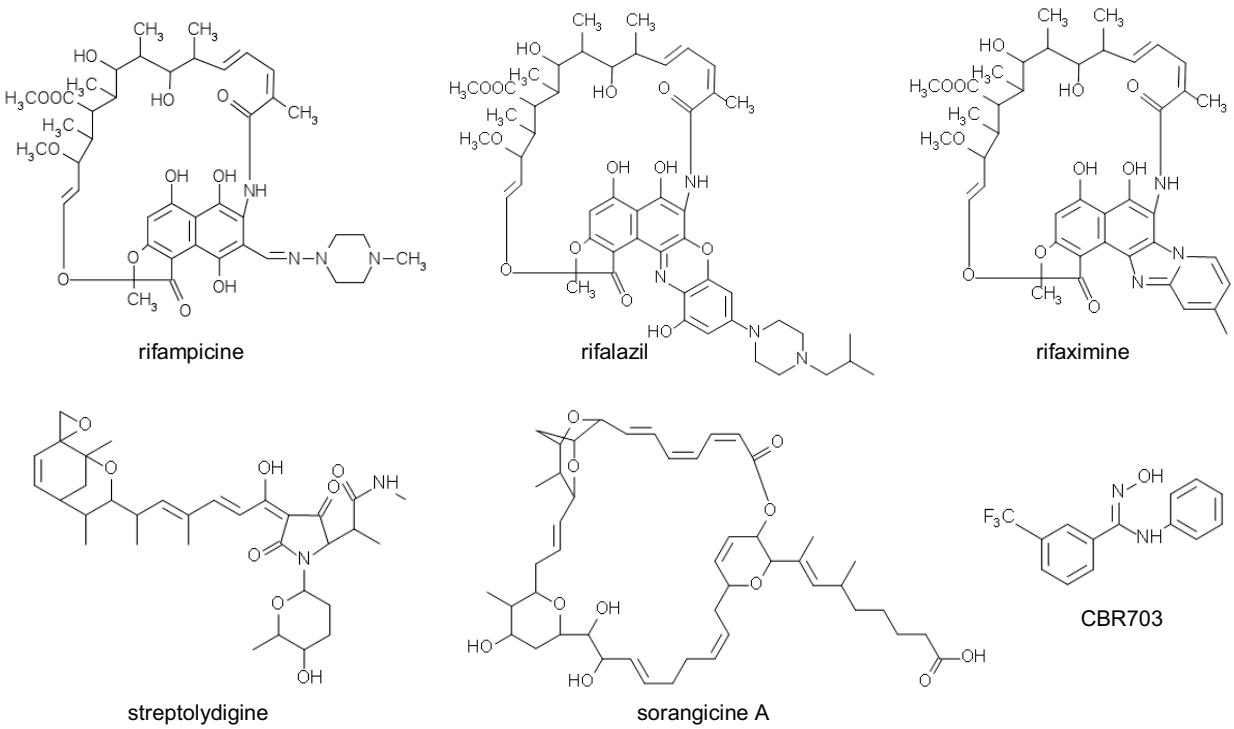


Figure 26 : Structure chimique des inhibiteurs de l'ARNP ciblant le canal principal.

D.I)5. La myxopyronine

La myxopyronine est un antibiotique naturel de la classe des 3-acyl-4-hydroxy-α-pyronènes produit par *Myxococcus fulvus* Mxf50 et qui a été isolée pour la première fois en 1983 (Irschik, J. Antibiot., 1983). Deux formes de myxopyronine ont été isolées : les myxopyronines A et B qui diffèrent par la présence d'un groupe méthyl supplémentaire pour la forme B (A : *n*-C_3H_7, B : *n*-C_4H_9). Généralement la myxopyronine A est le composé majoritaire mais la myxopyronine B est plus active (Irschik, J. Antibiot., 1983). Elles sont actives sur les bactéries à Gram-positif mais aussi sur certaines bactéries à Gram-négatif : *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Escherichia coli* DH21tolC. Pour toutes ces espèces [CMI] ≤ 12,5µg/ml (Irschik, J. Antibiot., 1983 Hu, J. Org. Chem., 1998). La forme myxopyronine B est la plus généralement utilisée et des analogues ont été synthétisés. Parmi ces analogues seule la forme desméthyl myxopyronine B permet d'obtenir une meilleure efficacité car la molécule est très sensible aux changements apportés dans sa structure (Doundoulakis, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004 ; Lira, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2007). En 2008, deux articles ont proposé un mécanisme d'action pour la myxopyronine. Ces deux mécanismes sont exposés dans l'**article n°2**. Le premier suggère que la

molécule agit par un mécanisme allostérique qui bloque le « clamp » dans un état fermé ou semi-fermé empêchant la partie avale de l'ADN d'entrer dans le sillon principal de l'ARNP et donc, empêchant la fusion de l'ADN (Mukhopadhyay, Cell, 2008). Le deuxième article suggère que la myxopyronine agit en stabilisant le repliement de la région β' « switch-2 » ce qui bloque des interactions cruciales avec l'ADN et par conséquent empêche le positionnement correct de la partie avale (-3 à +15) de l'ADN et la propagation de la fusion de l'ADN au-delà de la position -3 (Belogurov, Nature, 2009). Par l'analyse structurale et l'analyse des mutants résistants à la myxopyronine, les deux articles montrent que les déterminants de liaison de la myxopyronine se trouvent au niveau de la région β' « switch-2 » qui agit comme une « charnière » qui contrôle le mouvement du domaine « clamp » de l'ARNP. La liaison de la myxopyronine à l'ARNP induit un changement de conformation de la région « switch-2 », ce repliement serait nécessaire pour ouvrir le site de liaison à la myxopyronine. Dans les deux cas, il a aussi été démontré que l'effet de la myxopyronine dépendait de l'ordre d'addition puisque celle-ci n'inhibe la transcription que si elle est ajoutée avant l'ADN. Ceci suggère que la myxopyronine agit lors de la phase précoce de la transcription et certainement lors de la formation du complexe promoteur-ARNP, en accord avec les mécanismes d'action proposés plus haut.

La même cible et le même mécanisme d'action ont été trouvés pour la corallopyronine, un antibiotique de structure proche de la myxopyronine et pour la ripostatine qui n'est pas structurellement reliée à la myxopyronine et à la corallopyronine (Mukhopadhyay, Cell, 2008).

D.I)6. Les corallopyronines

Les corallopyronines sont des molécules produites par la souche *Corallococcus* (*Myxococcus*) *coralloides* Cc c127 découvertes en 1984 (Irschik, J. Antibiot., 1984). Il en existe trois formes corallopyronine A, B et C structurellement proches des myxopyronines. Les formes A et B diffèrent par la présence d'un groupe méthyl supplémentaire pour la forme B. La forme C diffère de la forme A par la présence d'un groupe furane. La forme A est le composé majoritaire. La corallopyronine A est essentiellement active sur les bactéries à Gram-positif. Elle n'a pas d'effet sur les ARNP eucaryotes. La corallopyronine A inhibe plus fortement la synthèse d'ARN que la myxopyronine à une concentration donnée. Cette différence est peut-être dû au rôle important de la chaîne secondaire en C-3 qui constitue la seule différence entre la corallopyronine et la myxopyronine. Une première étude a montré que la corallopyronine inhibe la synthèse d'ARN même après que la réaction d'élongation ait commencée suggérant un mode d'action comparable à

celui de la streptolydigine et différent de celui de la rifampicine (Irschik, J. Antibiot., 1984). Mais, une étude de 2008 (Mukhopadhyay, Cell, 2008) a montré que la corallopyronine a le même site de liaison et le même mécanisme d'action que la myxopyronine qui agit sur l'étape d'initiation de la transcription. Chez *S. aureus* il n'y a pas de résistance croisée entre la rifampicine et la corallopyronine ce qui rend cette molécule intéressante pour le traitement des infections dues aux bactéries mutantes résistantes à la rifampicine (O'Neill, Antimicrob. Agents Chemoter., 2000).

D.I)7. Les ripostatines (Irschik, J. Antibiot., 1995)

Les ripostatines sont des macrocycles produits par la souche *Sorangium cellulosum* So ce377. Il existe deux formes de ripostatine A et B qui sont actives contre les bactéries à Gram-positif et en particulier contre les eubactéries. Les ripostatines n'ont pas d'effet ou un effet mineur (ripostatine B) contre les levures et les champignons. Les deux composés ont un effet inhibiteur comparable. La ripostatine A agit plutôt sur l'initiation de la transcription que sur l'élongation. Chez *S. aureus,* il n'y a pas de résistance croisée entre la ripsotatine A, la rifampicine et la sorangicine. Ces résultats suggèrent que le site de liaison de la ripostatine A sur l'ARNP ne chevauche pas ceux de la rifampicine et de la sorangicine. En effet, une étude de 2008 (Mukhopadhyay, Cell, 2008) a montré que la ripostatine possède le même site de liaison et le même mécanisme d'action que la myxopyronine qui cible l'élément « switch-2 » à la base du domaine β' « clamp » et agit avant sur la formation du complexe ouvert avant la synthèse du brin d'ARN.

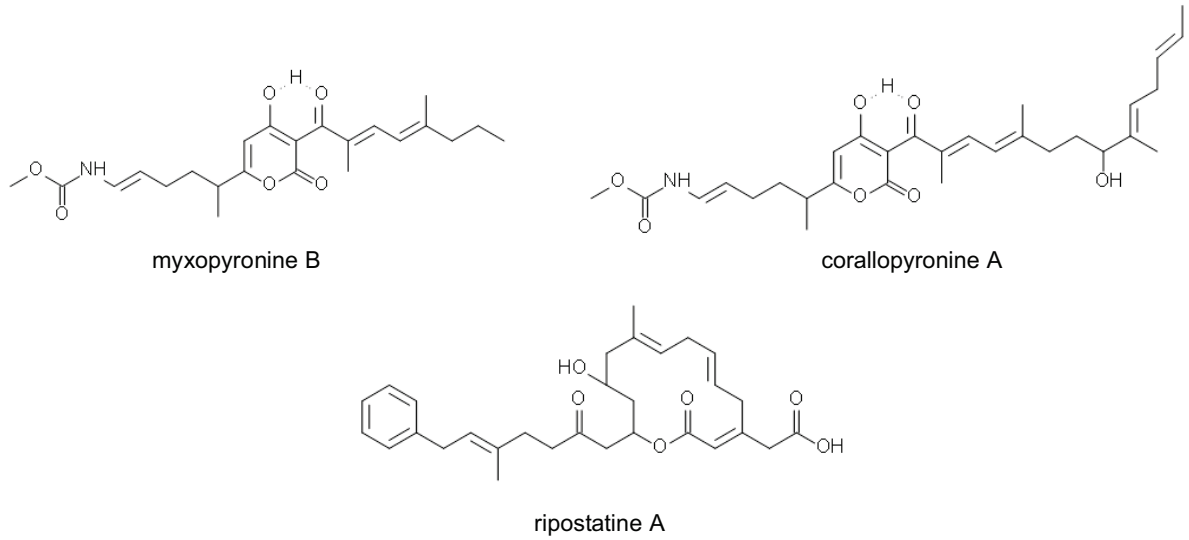


Figure 27 : Structure chimique des inhibiteurs de l'ARNP ciblant le domaine « switch-2 ».

D.II) Les molécules ciblant le canal de sortie de l'ARN

D.II)1. La lipiarmycine

La lipiarmycine est un antibiotique décrit pour la première fois en 1975 (Coronelli, J. Antibiot., 1975 ; Parenti, J. Antibiot., 1975 ; Sergio, J. Antibiot., 1975), aussi connu sous les noms de clostomicine (Omura, J. Antibiot., 1986), tiacumicine (Theriault, J. Antibiot., 1987 ; Swanson, Antimicrob. Agents Chemother., 1991), OPT-80, Par-101, et fidaxomicine (Sullivan, Ann. Pharmacother., 2010). Cette molécule est produite par plusieurs micro-organismes : *Actinoplanes deccanensis* ATCC21938, *Micromonospora echinospora subsp. armeniaca subsp. nov.* et par *Dactylosporangium aurantiacum*. Il s'agit d'un antibiotique macrocyclique de 1073−1099 $g.mol^{-1}$, légèrement acide, actif contre un large spectre de bactéries à Gram-positif (Coronelli, J. Antibiot., 1975), et en particulier contre les souches de *Clostridium*. Dès 1975 il a été décrit comme un inhibiteur de la transcription et, de façon moindre, de la réplication de l'ADN (Coronelli, J. Antibiot., 1975 ; Sergio, J. Antibiot., 1975). La lipiarmycine ne montre pas de résistance croisée avec un certain nombre d'antibiotiques connus tels que la rifampine, la penicilline, la streptomycine, la tétracycline, la novobiocine, la néomycine, l'erythromycine, le chloramphenicol, la cephaloridine, la streptothricine, la bicatracine et l'oleandomycine (Coronelli, J. Antibiot., 1975). Mais récemment, des résultats suggérant une résistance croisée partielle entre la lipiarmycine et la myxopyronine ont été rapportés (Mukhopadhyay, Cell, 2008 ; Belogurov, Nature, 2009).

La lipiarmycine n'est pas absorbée par les intestins ce qui lui confère un potentiel thérapeutique important pour certaines infections gastro-intestinales. Elle est d'ailleurs en essais cliniques de phase 3 sous le nom d'OPT-80 (Optimer Pharmaceuticals) pour le traitement des diarrhées associées à *Clostridium difficile* (Ackermann, Antimicrob. Agents Chemother., 2004 ; Credito, Antimicrob. Agents Chemother., 2004 ; Finegold, Antimicrob. Agents Chemother., 2004) et en essais cliniques de phase 2 sous le nom de Par-101 (Par pharmaceuticals) pour lutter contre les Enterococci résistants à la vancomycine.

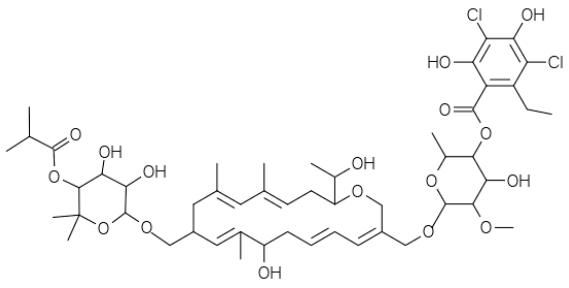
En dehors des ansamycines, la lipiarmycine est le seul inhibiteur transcriptionnel potentiellement utilisable en thérapie. Cependant, celui-ci est moins actif que la rifampicine sur la transcription *in vitro* dirigée par l'ARNP de *E .coli* puisque des doses de 10 à 20 fois supérieures sont nécessaires pour obtenir le même niveau d'inhibition (Talpaert, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975).

Bien que la lipiarmycine ait été découverte depuis plus de trente ans, son mécanisme d'action reste assez méconnu. Dès 1975, il a été déterminé qu'elle agirait sur la réaction d'initiation

de la transcription plutôt que sur l'élongation (Talpaert, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975 ; Sergio, J. Antibiot., 1975). Les premières expériences de 1979 (Sonenshein, J. Mol. Biol., 1979) faites sur des extraits cellulaires suggèrent que la molécule empêcherait la formation de la première liaison internucléotidique. Elle n'inhibe pas la liaison de l'ADN à l'ARNP. Au contraire de la rifampicine, elle n'a qu'un effet faible lorsque le facteur σ n'est pas associé à l'ARNP. Elle inhibe la transcription précoce du bactériophage SPO1 dépendante du facteur de transcription σ^A de son hôte, *B. subtilis*, mais n'agit pas sur les transcriptions moyennes et tardives qui sont, elles, dépendantes des deux polypeptides, gp33 et gp34, codés par le génome du phage (Osburne, J. Virol., 1980). Ces résultats montrent pour la première fois une modulation d'effet d'un inhibiteur sur la transcription dépendante du facteur σ associé à l'ARNP. La rifampicine pourrait également présenter un effet dépendant des facteurs σ (Wegrzyn, FEBS Lett., 1998), mais ces résultats restent à confirmer.

En 2006, notre équipe a déterminé une mutation conférant une résistance à de fortes concentrations de lipiarmycine chez *B. subtilis*. Cette résistance est due à la substitution de le résidu R326 de la sous-unité β' par un résidu L. Par analogie avec la structure tridimensionnelle de l'ARNP de *T. aquaticus*, il a été déterminé que cette mutation était localisée sur la sous-unité β' au niveau du canal principal, à proximité de la région 3.2 de σ et sur la face opposée du site de liaison de la rifampicine (Gualtieri, Antimicrob. Agents Chemother., 2006). Cette zone de fixation est intéressante car, étant éloignée de la zone où se lie la rifampicine, elle représente une nouvelle cible potentielle pour les antibiotiques. De plus, la région 3.2 de σ est un des domaines les plus divergents de σ.

Un article de 2008 (Kurabachew, J. Antimicrob. Chemother., 2008) a montré que la lipiarmycine avait une bonne activité contre des souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à la rifampicine et ne présentait aucune résistance croisée avec la rifampicine. Cette étude est particulièrement intéressante car elle suggère que l'utilisation thérapeutique de la lipiarmycine pourrait être étendue à d'autres applications que le traitement des maladies gastro-intestinales de cause bactérienne.



lipiarmycine

Figure 28 : Structure chimique de la lipiarmycine.

D.III) Les molécules ciblant le canal secondaire de l'ARN polymérase

Le canal secondaire permet l'entrée des NTPs au niveau du site actif. La fixation d'inhibiteurs au niveau de ce canal peut entrainer des perturbations au niveau du passage des NTPs vers le site actif, ou le fonctionnement de celui-ci.

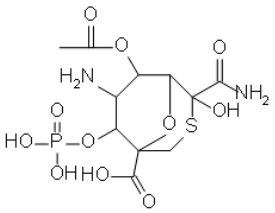
D.III)1. La microcine J25

La microcine J25 est un peptide cyclique de 21 acides aminés codé par un plasmide et qui a été isolé en 1992 à partir de fécès humains (Salomón, J. Bacteriol., 1992). Elle est produite en phase stationnaire par différentes souches d'Enterobactéries et en particulier par *E. coli* dans un milieu pauvre en nutriments (Chiuchiolo, J. Bacteriol., 2001). Le composé est principalement actif sur des genres ou des espèces bactériennes proches des souches productrices, donc actif sur des bactéries à Gram-négatif, en particulier les espèces de *Salmonella* et de *Shigella*. Mais les souches productrices sont elles-mêmes résistantes à la microcine qu'elles produisent. La famille des microcines compte plusieurs membres dont les mieux caractérisés sont ColV, MccB17 et Mcc7. La microcine J25 est le seul représentant du groupe immunitaire J. Elle possède une structure inhabituelle avec un segment cyclique dû à la liaison de la G1 et du E8 et une queue qui passe à travers le segment cyclique, ce qui lui confère une structure en « queue de lasso » (Wilson, J. Am. Chem. Soc., 2003). Chez *E. coli,* les mutations conférant une résistance à la microcine J25 sont principalement localisées au niveau des gènes codant pour des protéines d'enveloppe (FhuA, TonB, ExbB et SbmA) (Salomón, J. Bacteriol., 1993 ; Salomón, J. Bacteriol., 1995) indiquant que l'entrée de la molécule est dépendante de ces protéines. Mais des mutations ont été localisées sur le gène *rpoC* codant pour la sous-unité β' de l'ARNP, au niveau des segments conservées F, G et G', indiquant que l'ARNP est la cible de la microcine J25 (Delgado, J. Bacteriol., 2001 ; Yuzenkova, J. Biol. Chem., 2002). En corrélation avec cette mutation, il a été montré que la molécule inhibait la transcription *in vitro* et *in vivo*. Les mutations dans l'ARNP conférant une résistance à la microcine J25 ont permis de définir son site de liaison. Celui-ci est localisé autour de la circonférence du canal secondaire. La molécule ne contacterait donc pas le site actif situé plus profondément dans le canal primaire mais obstruerait complètement le canal secondaire, empêchant ainsi la pénétration des nucléotides au sien du site catalytique (Yuzenkova, J. Biol. Chem., 2002 ; Mukhopadhyay, Mol. Cell, 2004 ; Adelman, Mol.

Cell, 2004). La microcine J25 semble aussi inhiber la pyrophospholyse, la transcription « backtracking », et le clivage dépendant des facteurs Gre (Adelman, Mol. Cell, 2004). Les mutations trouvées au niveau du segment F de *rpoC* montrent que le site de liaison de la microcine J25 chevauche en partie celui de la streptolydigine, suggérant que leurs mécanismes d'action pourraient être similaires.

D.III)2. La tagetitoxine

La tagetitoxine est une phytotoxine produite par *Pseudomonas syringae pv. tagetis* et décrite par Mitchell et Durbin en 1981 (Mitchell, Physio. Plant Path., 1981). Elle inhibe préférentiellement l'ARNP III eucaryote (Steinberg, J. Biol. Chem., 1990) mais aussi l'ARNP bactérienne. Par contre, elle n'inhibe pas la transcription chez les phages (Mathews, J. Biol. Chem, 1990). Le mécanisme d'action de la tagetitoxine n'a pas encore été entièrement élucidé. Une première étude indique que la molécule agit sur l'étape d'élongation de la transcription mais qu'elle n'inhibe pas la liaison des NTPs ou la formation de la liaison phosphodiester (Mathews, Biochemistry, 1994). La structure du complexe formé par l'ARNP de *T. thermophilus* et par la tagetitoxine a été résolue par cristallographie en 2005. Cette structure apporte quelques indications sur le mécanisme d'action de la molécule. Son site de liaison est localisé à la base du canal secondaire, adjacent au site actif défini par son ion Mg^{2+} et chevauchant le site de liaison de ppGpp. La liaison de la molécule sur l'ARNP n'induit pas de changements de conformation significatifs au niveau de l'ARNP. Cependant, la liaison de la tagetitoxine à l'ARNP près du site catalytique forme un site de liaison spécifique pour un troisième ion Mg^{2+} proche du site actif. La liaison de cet ion pourrait perturber la liaison de deuxième ion Mg^{2+} qui permet la stabilisation des NTPs entrants au niveau du site actif ou perturber l'alignement de ceux-ci par rapport au site actif. En conséquence, la fixation du substrat serait défavorisée, le complexe enzymatique serait stabilisé dans un état inactif, inhibant toutes les réactions catalytiques. La proximité du site de liaison de la tagetitoxine avec celui de ppGpp ne corrèle pas avec des modes d'action similaires puisque la molécule ne déstabilise pas le complexe ouvert (Vassylyev, Nat. Struct. Mol. Biol., 2005). Ces données, ainsi que la construction de mutants recombinants de l'ARNP résistants à la tagetitoxine, confirment que l'ARNP bactérienne est bien une cible de la tagetitoxine *in vitro*. L'absence d'inhibition de la croissance bactérienne observée *in vivo* peut être due à une mauvaise perméabilité de la molécule ou à sa métabolisation en une forme inactive (Mathews, J. Biol. Chem., 1990). Pour pouvoir utiliser celle molécule en clinique des travaux de synthèse chimique ou d'analogues structuraux sont nécessaires.



tagetitoxine



microcine J25

Figure 29 : Structure chimique des inhibiteurs de l'ARNP ciblant le canal secondaire.

D.IV) Les inhibiteurs ciblant d'autres éléments de l'ARNP ou dont le site de liaison n'a pas été déterminé

Cette rubrique comprend des molécules dont le site de fixation supposé est localisé sur d'autres éléments de l'ARNP que ceux précédemment présentés, dont le site de liaison n'a pas encore été déterminé, ou dont l'effet sur la transcription n'a pas encore été clairement démontré.

D.IV)1. Le peptide GE23077

GE23077 est un inhibiteur de l'ARNP isolé en 2004 (Ciciliato, J. Antibiot., 2004) lors d'un criblage d'agents antibactériens effectué chez des souches peu communes d'Actinomyces. La souche productrice a été classée comme appartenant à *Actinomadura* sp. En phase stationnaire elle produit un complexe composé de deux couples d'isomères, les facteurs A1, A2 et B1, B2. La structure de ces composés a été résolue en 2005 (Marazzi, J. Antibiot., 2005). Il s'agit d'un heptapeptide cyclique contenant 4 acides aminés rares : l'iso-sérine, l'acide α-amino-malonique, l'acide α, β-diaminopropanoique, et la β, γ-dihydroxyglutamine. Les formes A et B diffèrent par la position d'un groupe acyl sur une chaine latérale de l'acide α, β-diaminopropanoique. A1 et A2 sont des épimères ne différant que par la chiralité d'un résidu acide α-amino-malonique, tout comme B1 et B2. Les différentes formes de GE23077 inhibent l'ARNP d'*E. coli* et de *B. subtilis* avec une IC_{50} de l'ordre de 20 nM et sont aussi capables d'inhiber l'ARNP d'*E. coli* résistante à la rifampicine à une concentration comparable (Ciciliato, J. Antibiot., 2004 ; Sarubbi, Eur. J. Biochem., 2004). Par contre, ils n'ont pas d'effet sur l'ADN polymérase d'*E. coli*. Malgré leur bonne activité sur l'ARNP bactérienne purifiée ces composés possèdent un spectre très étroit puisqu'il se limite à *Moraxella catarrhalis* et de façon plus marginale à *Neisseria gonorrrhoeae* et *M. smegmatis*. Cette différence est surement due à la mauvaise perméabilité de ces composés à travers la membrane à cause de leur

caractère fortement hydrophile. Mais, les différentes modifications effectuées en vue de réduire ce caractère hydrophile n'ont pas abouti à une meilleure activité des molécules (Mariani, Bioorg. Med. Chem. Lett., 2005). Les peptides GE23077 agissent sur l'initiation de la transcription et ont un mécanisme d'action proche de celui de la rifampicine. Cependant, leur site de liaison est probablement différent puisque GE23077 est actif sur l'ARNP Rif^R (Sarubbi, Eur. J. Biochem., 2004).

D.IV)2. Les pyrrothines

Les membres de la famille des pyrrothines ont été découverts en 1955. Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau pyrrolinodithiol (Celmer, J. Am. Chem. Soc., 1955). Les composés les mieux caractérisés sont la thiolutine et son analogue structural l'holomycine. La thiolutine fait parti des douze métabolites produits par *Streptomyces luteoreticuli*. Il s'agit d'un antibiotique à large spectre capable d'inhiber la croissance des bactéries, des levures, et des champignons (Seneca, Antibiot. Chemother., 1952 ; Jimenez, Antimicrob. Agents Chemother., 1973). Cette molécule a été classée comme inhibiteur de l'ARNP (Jimenez, Antimicrob. Agents Chemother., 1973). Elle semble être active sur l'ARNP de levure (Tipper, J. Bacteriol., 1973). Son mode d'action n'est pas bien déterminé. Elle inhibe la synthèse des protéines et de l'ADN mais elle est plus active sur la synthèse d'ARN. Des études ont suggéré que la thiolutine agissait sur l'élongation de la transcription (Khachatourians, J. Bacteriol., 1974) alors qu'une autre rapporte un effet sur l'initiation de la transcription (Sivasubramanian, Mol. Gen. Genet., 1976) mais l'effet de la molécule sur l'ARNP *in vitro* n'a pas été clairement démontré. Un troisième mécanisme d'action à été proposé. Les bactéries traitées avec la thiolutine présentent les caractéristiques de bactéries en manque de nutriments, elles arrêtent leur consommation de glucose et accumulent du ppGpp. Ces observations ont conduit à l'hypothèse que la molécule pourrait inhiber le transport cellulaire à travers la membrane des bactéries (Joshi, Antimicrob. Agents Chemother., 1982 ; Bergmann, Antonie Van Leeuwenhoek, 1989). Des mutants résistants à la thiolutine ont été trouvés chez *E. coli* (Sivasubramanian, Mol. Gen. Genet., 1976) et chez *S. typhimurium* (Joshi, Antimicrob. Agents Chemother., 1982) mais le locus des mutations n'a pas encore été déterminé. Cependant, il a été montré que la molécule ne présentait pas de résistance croisée avec d'autres inhibiteurs de la transcription.

D.IV)3. L' ureidothiophene

Le criblage d'une large librairie de composés commercialement disponibles contre l'ARNP

de *S. aureus* a permis d'identifier la famille des ureidothiophenes. Les composés de cette famille de faible poids moléculaire ont en commun un motif 2-ureidothiophene-3-carboxylate commun (Arhin, Bioorg. Med. Chem., 2006). Son effet sur la synthèse de l'ARN et des potéines indique qu'elle agit sut la transcription chez *S. aureus*. Elle présente une bonne activité antibactérienne contre certaines souches de *S. aureus* et *S. epidermidis* mais pas d'activité sur les bactéries à Gram-positif. Plusieurs analogues ont été synthétisés. L'utilisation en clinique de ces molécules pourrait être limitée car elles ont une forte propension à générer des résistants, par contre, elles restent actives contre des souches de *S. aureus* résistantes à la rifampicine, suggérant que leur site de liaison et leur mécanismes d'actions sont différents (Arhin, Bioorg. Med. Chem., 2006).

D.IV)4. Le groupe SB

Ce groupe a été isolé lors du criblage d'une librairie de composés synthétiques inhibant l'interaction core/σ^{70} chez *E. coli* (André, J. Antimicrob. Chemother., 2006). Il s'agit de composés de faible poids moléculaire portant un cycle aromatique. Des études d'interaction ont montré que la liaison core/σ était bien inhibée spécifiquement en présence de ces molécules. Parmi ce groupe, la molécule SB2 a été plus particulièrement étudiée. Comme attendu au vu des résultats des études d'interactions, SB2 est capable d'inhiber *in vitro* la transcription dépendante du facteur σ à une IC_{50} de l'ordre de 2-15 µM mais aussi la transcription indépendante du facteur σ à une IC_{50} un peu plus élevée, ce qui indique que la cible du groupe SB se trouve sur le core de l'ARNP. L'activité sur la transcription se traduit par une bonne activité bactéricide sur les bactéries à Gram-positif (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* et *B. anthracis),* y compris sur des souches de *S. aureus* résistantes à la rifampicine. Les bactéries à Gram-positif sont majoritairement résistantes au composé, cela est probablement dû à l'imperméabilité de leur paroi. Parmi ce groupe, le composé SB13 a montré une efficacité comparable à celle de la rifampicine sur les biofilms formés par *S. epidermidis*. L'avantage majeur de ce composé par rapport à la rifampcine est qu'aucune sélection de mutants n'a été observée contrairement à la fréquence relativement élevée rapportée pour la rifampicine (Gualtieri, J. Antimicrob. Chemother., 2006). Cependant le groupe SB possèdent des limitent pharmacologiques du fait de sa forte hydrophobicité et de son fort taux de liaison à la protéine sérum albumine humaine.

D.IV)5. La zwittermicine A

La zwittermicine A est un aminopolyol linéaire fortement polaire qui constitue une nouvelle classe structurale d'antibiotique. Elle a été isolée à partir de la bactérie de sol *Bacillus cereus* en 1994 (Silo-Suh, Appl. Environ. Microbiol., 1994 ; Stabb, Appl. Environ. Microbiol., 1994). Son activité est très large puisqu'elle inhibe la croissance des microorganismes eucaryotes (levures et champignons) et procaryotes tels qu'*E. coli*. Deux classes de mutations conférant une résistance à la zwittermicine A ont été caractérisées chez *E. coli*. La première est constituée de mutations touchant les gènes *hemA*, *hemB*, *hemL*, *ubi*, *cydAB*, et *atp* qui inhibent la génération de la force motrice due aux protons. Et la deuxième est constituée des mutations localisées sur les gènes *rpoB* et *rpoC* qui codent pour les sous-unités β et β'. Cette dernière classe de mutations pourrait suggérer que la zwittermicine A agit en inhibant la transcription mais aucun effet de la molécule sur la synthèse de l'ADN ou de l'ARN n'a été constaté. Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer ce résultat. La molécule pourrait inhiber la transcription de manière promoteur-spécifique (Stabb, Mol. Microbiol., 1998), comme il a été rapporté pour d'autres antibiotiques (Keilman, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975 ; Sarkar, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977 ; Bruzik, Biochemistry, 1987). Une autre hypothèse est que celle-ci n'agit pas sur la transcription mais sur la mutation des gènes *rpoB* et *rpoC* ce qui pourrait altérer l'expression d'autres gènes dont les produits conduiraient à la résistance à la zwittermicine A (Stabb, Mol. Microbiol., 1998).

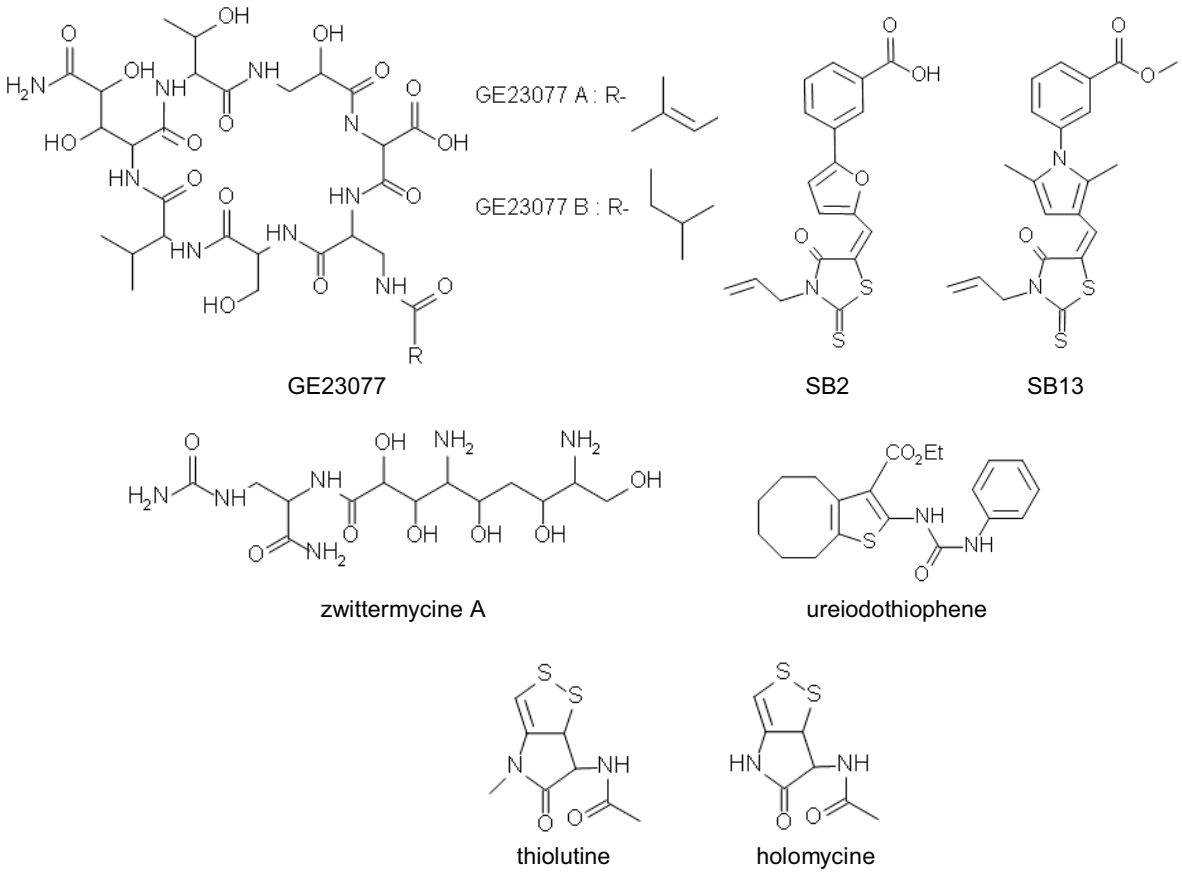


Figure 30 : Structure chimique des inhibiteurs de l'ARNP ciblant d'autres éléments de l'enzyme ou dont le site de liaison n'a pas été déterminé.

D.V) Articles n°1 et n°2

Article n°1

G Model
ANTAGE-3220; No. of Pages5
ARTICLE IN PRESS
International Journal of Antimicrobial Agents xxx (2010) xxx–xxx
Contents lists available at ScienceDirect
International Journal of Antimicrobial Agents
journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Review

Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns

Audrey Tupin[a,b,*], Maxime Gualtieri[a,b], Françoise Roquet-Banères[a,b], Zakia Morichaud[a,b], Konstantin Brodolin[a,b], Jean-Paul Leonetti[a,b]

[a] Université Montpellier 1, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS), CNRS, UMR 5236, 4 Bd Henri IV, CS 69033, F-34965 Montpellier, Cedex 2, France
[b] Université Montpellier 2, CPBS, F-34095 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Rifampicin resistance
Antibiotic
Transcription
Bacterial ecology

ABSTRACT

The first antibiotic of the ansamycin family, rifampicin (RIF), was isolated in 1959 and was introduced into therapy in 1962; it is still a first-line agent in the treatment of diseases such as tuberculosis, leprosy and various biofilm-related infections. The antimicrobial activity of RIF is due to its inhibition of bacterial RNA polymerase (RNAP). Most frequently, bacteria become resistant to RIF through mutation of the target; however, this mechanism is not unique. Other mechanisms of resistance have been reported, such as duplication of the target, action of RNAP-binding proteins, modification of RIF and modification of cell permeability. We suggest that several of these alternative resistance strategies could reflect the ecological function of RIF, such as autoregulation and/or signalling to surrounding microorganisms. Very often, resistance mechanisms found in the clinic have an environmental origin. One may ask whether the introduction of the RIF analogues rifaximin, rifalazil, rifapentine and rifabutin in the therapeutic arsenal, together with the diversification of the pathologies treated by these molecules, will diversify the resistance mechanisms of human pathogens against ansamycins.
© 2010 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Ansamycin derivatives such as rifampicin (RIF) are first-line antibiotics in the treatment of tuberculosis (TB), leprosy and a growing number of Gram-positive bacteria such as multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. Ansamycin was isolated in 1959 by Sensi et al. [1,2] from a strain of *Amycolatopsis mediterranei* (previously known as *Streptomyces mediterranei* and *Nocardia mediterranei*) and was introduced into therapy in 1962. Ansamycins are active against a large variety of organisms, including bacteria and eukaryotes. They have a broad activity against Gram-positive bacteria and, to a lesser extent, against Gram-negative bacteria. Interestingly, ansamycins are also active against the transcription machinery of the eukaryotic parasite *Plasmodium falciparum* [3,4].

Ansamycins are structurally characterised by a planar naphthoquinone ring in which positions 3 and 4 have been extensively modified by hemisynthesis to yield commercial antibiotics such as RIF. Interest in these molecules has recently increased with the US Food and Drug Administration (FDA) approval of several new ansamycin derivatives for treatment of a broader range of infectious diseases. For now, the ansamycins currently in therapeutic use are RIF, rifaximin, rifapentine, rifalazil and rifabutin.

The antimicrobial activity of ansamycins is due to their inhibition of bacterial RNA polymerase (RNAP). RIF binds to conserved amino acids in the active centre of the enzyme and blocks transcription initiation. A large proportion of the encountered resistance to RIF is due to mutations of these amino acids. These mutations often occur with high frequency, which compels the use of RIF almost exclusively in drug combinations, most commonly with isoniazid, as well as the restriction of its use to the treatment of TB and to emergencies.

Resistance to RIF by mutation of the target is widespread but not unique. Other mechanisms of resistance have been reported, such as duplication of the target, action of RNAP-binding proteins, modification of RIF and modification of cell permeability (Table 1). Bacteria and fungi are not isolated in nature, but exist in communities and need to communicate to be competitive. A majority of the low-molecular-weight compounds synthesised by microbes at low concentrations apparently act as cell-signalling molecules and directly or indirectly modulate transcription to favour symbiosis between these microorganisms [5]. As expected from a key player in the bacterial signalling network, RNAP is targeted by a variety of antibiotics that contain similar binding sites to RIF [6], and bacteria have developed highly diverse strategies to grow in the presence of these antibiotics. Some of these mechanisms confer

* Corresponding author. Tel.: +33 4 67 54 86 07; fax: +33 4 67 54 86 04.
E-mail address: audrey.tupin@univ-montp1.fr (A. Tupin).

0924-8579/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.017

Please cite this article in press as: Tupin A, et al. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. Int J Antimicrob Agents (2010), doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.017

Table 1
Summary of the different resistance mechanisms, listed together with the associated microorganisms and the resistance level.

Resistance mechanism	Species	Level of resistance	References
Mutation	*Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*	High to very high	[9,10,12,13,16,17]
Duplication of *rpoB*	*Nocardia farcinica*, *Amycolatopsis mediterranei*, *Actinomadura* sp.	High	[32]
RNAP-binding proteins	*Streptomyces coelicolor*, *M. tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Corynebacterium diphtheriae*	Intermediate to low	[35,38]
Modification of rifampicin	*Mycobacterium smegmatis* DSM 43756, *Bacillus* sp.	Intermediate to low	[41,43,44]
Modification of permeability	*Mycobacterium* sp., *Neisseria gonorrhoeae*	Low	[45,46]

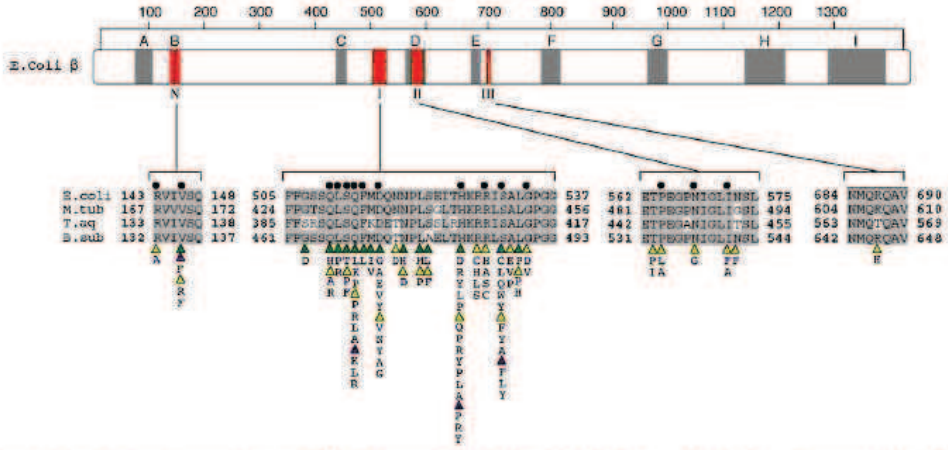


Fig. 1. Location of rifampicin (RIF) resistance mutations in the RNA polymerase (RNAP) β-subunit. The 1342-amino-acid-long β-subunit is represented by the light bar, with grey shaded areas corresponding to the highly conserved sequence segments, designated A–I, and with red shaded areas corresponding to RIF resistance clusters: mutations in *Mycobacterium tuberculosis* (green triangle), *Escherichia coli* (yellow triangle) and *Bacillus subtilis* (purple triangle). Important contacts between RIF and the β-subunit (black sphere). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

resistance to very high levels of RIF, whilst others only protect the bacteria against lower concentrations. These natural resistances cast light on the potential evolution of resistance to RIF and on other new transcription inhibitors in clinical development in the future.

2. Resistance by mutation of the target

Many RIF-resistant (RIF^R) strains of *Escherichia coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, etc. have been characterised, showing that resistance is most frequently conferred by mutations in the RNAP active centre. RIF interacts only with the β-subunit of RNAP encoded by *rpoB* [7] and its binding site is highly conserved among bacteria (Fig. 1). Binding of the molecule to RNAP involves 12 amino acid residues (Fig. 2). Mutagenesis of each of these residues, except one, generates a resistant phenotype [7]. Spontaneous resistance to RIF is mainly associated with single point mutations resulting in amino acid substitutions and is less frequently associated with a few insertions or deletions. Ninety-five percent of these mutations map to four regions in the *N*-terminal half of the β-subunit polypeptide [8] involved in the binding of RIF. In *E. coli*, RIF resistance mutations are usually located in the central region of the polypeptide, within cluster I (amino acids 507–533), cluster II (amino acids 563–572) and cluster III [9,10], and they can also occur near the *N*-terminus of the β-subunit [11]. In *M. tuberculosis*, resistance to RIF is mainly associated with mutations in an 81-bp hot-spot region (codons 432–458 in cluster I) of *rpoB* [12], with 41% of resistant clinical isolates carrying a mutation of S455, 36% with a mutation of H440 and 9% with a mutation of D430 [13]. A mutation at the beginning of the *rpoB* gene, the amino terminal of cluster I, has also been reported (V176F) [14,15]. This mutation confers high-level resistance to RIF and may account for more than 1% of all RIF^R strains [16]. RIF resistance mutations have also been found in the *N*-terminus (V135F) and in cluster I (Q469K, Q469L, Q469R, H482D, H482P, H482R, H482Y, S487F, S487L and S487Y) of *B. subtilis rpoB* [17] as well as in *Helicobacter pylori* (V149F) [16].

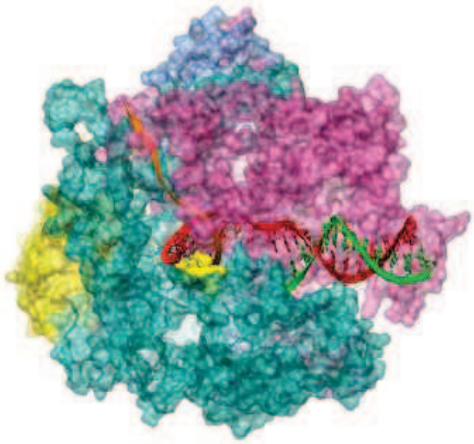


Fig. 2. Rifampicin (RIF)-binding site in the active site of RNA polymerase. The model was built from the Protein Data Bank co-ordinates of the *Thermus aquaticus* core complex (116V [7]) and from a *Thermus thermophilus* core scaffold complex (2O5I [40]). The α-subunit is represented in yellow, the β-subunit in blue, the β′-subunit in magenta, the DNA double helix in red and green, RNA in orange and RIF in bright yellow. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Please cite this article in press as: Tupin A, et al. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. Int J Antimicrob Agents (2010), doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.017

In most cases, a point mutation in *rpoB* only confers RIF resistance, but recently a point mutation was shown to confer resistance to and dependence on RIF [18]. The molecular basis of this effect is not yet understood, but the finding itself casts doubt on the historical view that RIF acts by plugging the path of the elongating RNA as mentioned by Campbell et al. [7].

Resistance to transcription inhibitors that arise through point mutations of the target is not neutral for bacteria. In the case of RIF, these alterations in the target were repeatedly involved in deregulation of gene expression [19–23], possibly due to altered *rho*-dependent transcription termination [23]. A striking example is the recent report that many alterations in substrate utilisation patterns were observed in *B. subtilis* RIF^R mutants [17]. The consequences of this deregulation are, in most cases, reduced virulence [24,25] of the RIF^R mutants and a reduced fitness [26,27]. More prolonged treatment with RIF can result in strains with no fitness defect owing to compensatory mutations, and these strains with low- or no-cost resistance mutations are also the most frequent among clinical isolates [26].

3. Resistance by duplication of the target

Several bacterial species are naturally resistant to RIF owing to mutations in *rpoB*. *Nocardia* sp. are Gram-positive saprophytes present in the environment, with several species causing severe infections. *Nocardia farcinica* is an opportunistic pathogen that is considered a major multidrug resistance problem that is particularly frequent in Japan [28] and Europe [29,30]. The genome of *N. farcinica* IFM 10152 was recently sequenced [31] and the presence of two different RNAP β-subunit genes, *rpoB* and *rpoB2*, was detected. These two genes share a high degree of homology (88.8%) and careful comparison of their amino acid sequences revealed that the *Nocardia rpoB2* protein contains amino acid substitutions in RIF clusters I and II that are likely to confer RIF resistance [32]. The role of the altered gene in conferring resistance was confirmed by knockout of *rpoB2*, shedding light on a novel resistance mechanism. Such a mechanism may not be a rare event, as *rpoB* duplication is apparently widespread in *Nocardia* sp. and has recently been found in another closely related actinomycete, *Actinomadura* sp. strain ATCC 39727 [33]. It is not yet known whether the actinomycete *A. mediterranei*, which produces RIF, uses this strategy of duplication to resist this antibiotic. RIF mutations are known to affect gene expression and may result in an increase in antibiotic production in *Streptomyces* [21] and a change in carbon source assimilation in *B. subtilis* [34]. In light of these findings, the abovementioned duplications of mutated *rpoB* could either reflect signalling mechanisms between *N. farcinica* or *Actinomadura* sp. and other bacteria producing molecules sharing the same binding site as RIF, or the presence of dormant genes coding for molecules targeting transcription in their genomes.

4. Resistance induced by RNA polymerase-binding proteins

Although most cases of RIF resistance are due to mutations in the *rpoB* gene, some bacteria use other strategies. The actinomycete *Streptomyces coelicolor* is intrinsically resistant to low concentrations of RIF, and recently Newell et al. [35] showed that a RNAP-binding protein, *rbpA*, confers basal levels of RIF resistance to this microorganism. Experiments have demonstrated that *rbpA* expression is induced by low concentrations of RIF and that this molecule inhibited a promoter directing the transcription of a ribosomal RNA operon. In vitro experiments confirmed that RIF induces σ^R-dependent transcription of the *rbpA* gene and that *rbpA* stimulates σ^{HrdB}-dependent transcription from *rrnDp3*. The data presented also suggest that *rbpA* confers basal levels of resistance to RIF and that it is a novel regulator of rRNA synthesis in *S. coelicolor*. The authors point out that genes homologous to *rbpA* are present in *M. tuberculosis*, *M. leprae* and *Corynebacterium diphtheriae*. These genes could account for the transcriptional activity detected in *M. tuberculosis* following treatment with RIF [36].

dnaA is another RNAP-binding protein that partially protects RNAP from the effect of RIF. Transcription and replication are intricate mechanisms [37], since RNA is used as a primer for replication. The RNAP located at a replication origin provides the transcription activity necessary for initiation of replication and is protected from the action of RIF by origin-bound *dnaA*. *In vitro* experiments showed that the *dnaA* protein interacts directly with RNAP, and both the ATP-form and the ADP-form of the *dnaA* protein were found to alleviate the inhibition of RNAP by RIF at the *dnaA* promoter, although a higher concentration was necessary to achieve the effect when the ADP-form of *dnaA* was used [38].

σ factors are accessory proteins that bind to the core of RNAP to form the RNAP holoenzyme. Binding of the σ factor allows transcription initiation by directing specific recognition of the promoter and isomerisation of the RNAP–DNA complex. Wegrzyn et al. [39] have reported a differential effect on the inhibition of transcription by RIF depending on the σ factor. RIF was shown to inhibit transcription from the σ^{70}-dependent P_L promoter at a significantly lower concentration than transcription from the σ^{32}-dependent P_{groE} promoter. These results may only reflect a selectivity of RIF according to the nature of the σ factor bound to the core of RNAP and are probably more related to a response to stress rather than a true resistance.

5. Resistance by modification of rifampicin

Another strategy of resistance is to neutralise the antibiotic by covalent modification. Bacteria can inactivate RIF in a variety of ways, such as glucosylation, ribosylation, phosphorylation and decolourisation (Fig. 3). *Mycobacterium smegmatis* DSM 43756, a pathogen intrinsically resistant to this drug, inactivates RIF by ribosylation [41]. Structural studies have shown that the final product is obtained by formation of 23-(*O*-ADP-ribosyl)-RIF followed by removal of AMP and dephosphorylation, leading to 23-ribosyl-RIF. The strain expresses Arr enzymes that act as mono (ADP-ribosyl) transferases and catalyse the reaction of ADP-ribosylation of rifamycins. *arr* homologues are widely distributed in environmental bacteria and in *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cenocepacia*, *S. coelicolor*, *Corynebacterium glutamicum*, *Desulfitobacterium hafniense* and *Rhodopseudomonas palustris*. It was shown that RIF analogues modified at position C25 generate derivatives that are resistant to inactivation by ADP-ribosyl transferases from *M. smegmatis* [42]. Other species use a different mechanism of modification. For example, *Nocardia* sp. modify the antibiotic by glucosylation (23-OH group) and phosphorylation, but ribosylation is not observed. *Bacillus* strains and actinomycete-related species were also found to inactivate RIF through phosphorylation of the 21-OH group, RIF glucosylation (23-OH group) or decolourisation [43,44].

6. Resistance by modification of permeability

To be effective, an antibiotic has to reach its specific target in an efficient time frame and at sufficient concentration. One strategy to impair the action of an antibiotic is to prevent its entry to the cell. Some bacterial species that do not allow multiple antibiotics to accumulate in the cytoplasm are called 'intrinsically' resistant, whilst other antibiotic-susceptible bacteria can become resistant to multiple antibiotics. This occurs through two mechanisms: (i) the bacteria can be resistant or acquire resistance by

Please cite this article in press as: Tupin A, et al. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. Int J Antimicrob Agents (2010), doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.017

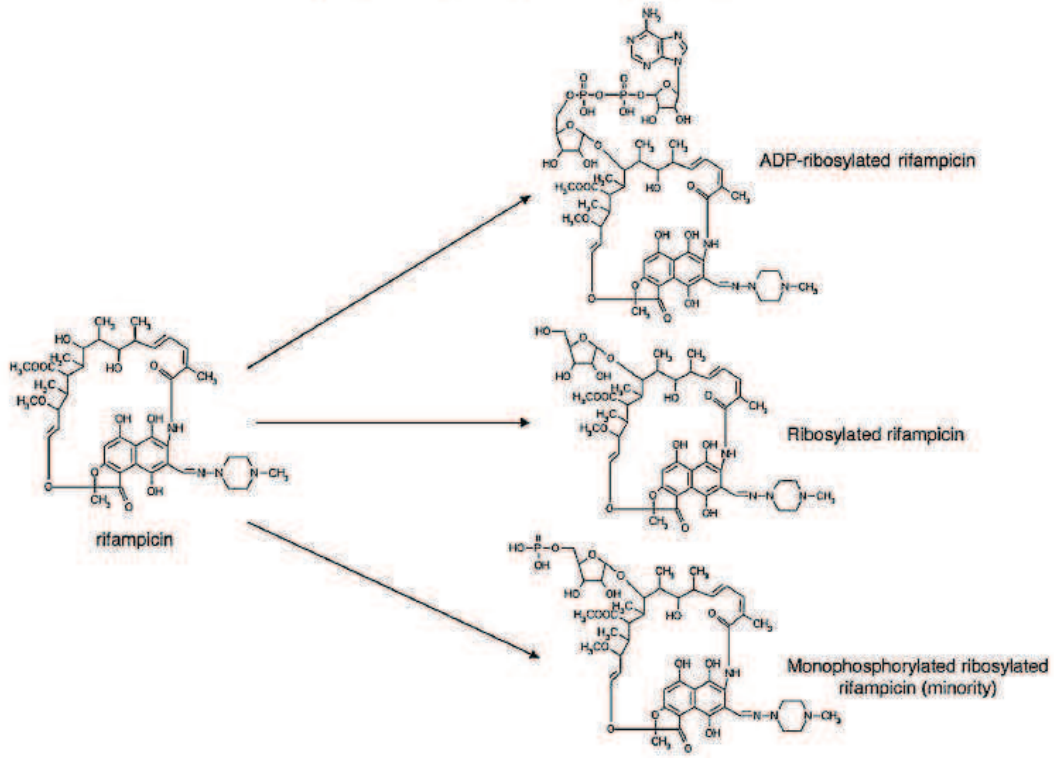


Fig. 3. ADP-ribosylation of rifampicin (RIF) by *Mycobacterium smegmatis*. RIF is inactivated by ADP-ribosylation in several bacteria, such as *M. smegmatis* DSM 43756. The different metabolites identified are presented.

decreasing the permeability of the membrane barriers; and (ii) they can also overexpress membrane-associated energy-driven efflux pumps reminiscent of the eukaryotic multidrug resistance pumps.

Mycobacteria are intrinsically resistant to many antibiotics and this property is often attributed to a low permeability of the mycobacterial cell wall and its specific lipid-rich character. Decades ago, a strain of *Mycobacterium intracellulare* exhibiting natural resistance to RIF was isolated. Its RNAP was found to be susceptible to RIF and experiments suggested that a permeability barrier against RIF was responsible for this resistance [45]. Several efflux pumps are also suspected to contribute to mycobacteria multidrug resistance. Siddiqi et al. [46] have pointed out a correlation between drug resistance and *Rv1258c* gene transcription levels of a clinical isolate of *M. tuberculosis* resistant to multiple antibiotics (RIF, ofloxacin, isoniazid and minomycin). Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) showed that the level of transcription of *Rv1258c* increased by a factor of 10 when the bacteria are grown in the presence of RIF or ofloxacin. These results suggest that efflux pumps can be induced in response to antibiotic treatment in *Mycobacteria*, consistent with the hypothesis of the involvement of efflux pumps in detoxification [47]. The *mtr* operon of *Neisseria gonorrhoeae* encodes an efflux pump system composed of the proteins *mtrCDE* [48,49]. This pump transports several antibiotics, and mutations in the *mtrR* gene, a transcriptional repressor of *mtrCDE*, induce overexpression of this efflux pump. This confers resistance to several antimicrobials, including rifamycins.

7. Conclusions

Bacteria use a variety of mechanisms to counter the actions of antibiotics, and RIF resistance or tolerance is a perfect example of this diversity. One may wonder what these genes are doing in these bacteria and whether they have additional functions. The RIF-binding domain is located in the catalytic site of the bacterial RNAP and is highly conserved among bacteria, but it has a high propensity to mutate, as observed, when RIF selection pressure is applied. These discrepancies remain to be understood.

The existence of multiple antibiotics sharing, at least partially, the same binding site as RIF, the presence of duplicated genes resistant and sensitive to RIF in the same bacteria, and the involvement of several RNAP-binding proteins in adaptation to low RIF concentrations are probably more revealing of the true function of this antibiotic. Bacteria live in a community and they must be competitive to survive in their environment. Apart from their killer function, RIF and these various other molecules at low concentrations could also find their usefulness in regulating the genes of surrounding bacteria to the benefit of the producer or the genes of the producer itself. We now have strong genomic evidence that these resistance mechanisms found in the clinic have an environmental origin. The most common soil bacteria are a reservoir of a previously underappreciated diversity of resistance genes that can be mobilised under selection pressure such as antibiotic therapy. This raises concerns about the future of our antibacterial arsenal. One may ask whether the introduction of the RIF analogues rifaximin, rifapentine, rifabutin and rifalazil to the therapeutic arsenal together with

Please cite this article in press as: Tupin A, et al. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. Int J Antimicrob Agents (2010), doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.017

the diversification of the pathologies treated by these molecules will diversify the resistance mechanisms of human pathogens to ansamycins.

Acknowledgments

KB is supported by a fellowship from the RTRS Infectiopole Sud (CPBS, Montpellier, France). AT is supported by the CNRS (Montpellier, France) and the Region Languedoc-Roussillon.

Funding: This work was funded by the CNRS.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

[1] Sensi P, Greco AM, Ballotta R. Rifomycin I. Isolation and properties of rifomycin B and rifomycin complex. Antibiot Annu 1959;7:262–70.
[2] Sensi P, Ballotta R, Greco M. Rifomycin V, Rifomycin O. A new antibiotic of the rifomycin family. Farmaco Sci 1960;15:228–34.
[3] Gardner MJ, Williamson DH, Wilson RJM. A circular DNA in malaria parasites encodes an RNA polymerase like that of prokaryotes and chloroplasts. Mol Biochem Parasitol 1991;44:115–23.
[4] Pukrittayakamee S, Viravan C, Charoenlarp P, Yeamput C, Wilson RJ, White NJ. Antimalarial effects of rifampin in *Plasmodium vivax* malaria. Antimicrob Agents Chemother 1994;38:511–4.
[5] Yim G, Huimi HH, Davies J. Antibiotics as signalling molecules. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2007;362:1195–200.
[6] Villain-Guillot P, Bastide L, Gualtieri M, Leonetti J-P. Progress in targeting bacterial transcription. Drug Discov Today 2007;12:200–8.
[7] Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. Cell 2001;104:901–12.
[8] Floss HG, Yu TW. Rifamycin—mode of action, resistance, and biosynthesis. Chem Rev 2005;105:621–32.
[9] Jin DJ, Gross CA. RpoB8, a rifampicin-resistant termination-proficient RNA polymerase, has an increased K_m for purine nucleotides during transcription elongation. J Biol Chem 1991;266:14478–85.
[10] Severinov K, Soushko M, Goldfarb A, Nikiforov V. Rifampicin region revisited. New rifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the β subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. J Biol Chem 1993;268:14820–5.
[11] Severinov K, Soushko M, Goldfarb A, Nikiforov V. Rif^R mutations in the beginning of the *Escherichia coli rpoB* gene. Mol Gen Genet 1994;244:120–6.
[12] Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet 1993;341:647–50.
[13] Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. Tuber Lung Dis 1998;79:3–29.
[14] Heep M, Odenbreit S, Beck D, Decker J, Prohaska E, Rieger U, et al. Mutations at four distinct regions of the *rpoB* gene can reduce the susceptibility of *Helicobacter pylori* to rifamycins. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1713–5.
[15] Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N. Mutations in the beginning of the *rpoB* gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1075–7.
[16] Heep M, Brandstatter B, Rieger U, Lehn N, Richter E, Rusch-Gerdes S, et al. Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol 2001;39:107–10.
[17] Perkins AE, Nicholson WL. Uncovering new metabolic capabilities of *Bacillus subtilis* using phenotype profiling of rifampin-resistant *rpoB* mutants. J Bacteriol 2008;190:807–14.
[18] Maguire BA, Wild DG. Identification of a mutation conferring antibiotic dependence in *Escherichia coli*. In: 48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 25–28 October 2008, Washington, DC. Washington, DC: ASM Press; 2008. p. 124.
[19] Sonenshein AL, Cami B, Brevet J, Cote R. Isolation and characterization of rifampin-resistant and streptolydigin-resistant mutants of *Bacillus subtilis* with altered sporulation properties. J Bacteriol 1974;120:253–65.
[20] Kawamura N, Kurokawa K, Ito T, Hamamoto H, Koyama H, Kaito C, et al. Participation of Rho-dependent transcription termination in oxidative stress sensitivity caused by an *rpoB* mutation. Genes Cells 2005;10:477–87.
[21] Hu H, Zhang Q, Ochi K. Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase β subunit) of *Streptomyces lividans*. J Bacteriol 2002;184:3984–91.
[22] Bergval IL, Klatser PR, Schuitema ARJ, Oskam L, Anthony RM. Specific mutations in the *Mycobacterium tuberculosis rpoB* gene are associated with increased *dnaE2* expression. FEMS Microbiol Lett 2007;275:338–43.
[23] Jin DJ, Walter WA, Gross CA. Characterization of the termination phenotypes of rifampicin-resistant mutants. J Mol Biol 1988;202:245–53.
[24] Adone R, Ciuchini F, Marianelli C, Tarantino M, Pistoia C, Marcon G, et al. Protective properties of rifampin-resistant rough mutants of *Brucella melitensis*. Infect Immun 2005;73:4198–204.
[25] Björkman J, Hughes D, Andersson DI. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:3949–53.
[26] Gagneux S, Long CD, Small PM, Van T, Schoolnik GK, Bohannan BJM. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Science 2006;312:1944–6.
[27] Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother 2004;53:203–7.
[28] Kageyama A, Yazawa K, Ishikawa J, Hotta K, Nishimura K, Mikami Y. Nocardial infections in Japan from 1992 to 2001, including the first report of infection by *Nocardia transvalensis*. Eur J Epidemiol 2004;19:383–9.
[29] Schaal KP, Lee H-J. Actinomycete infections in humans—a review. Gene 1992;115:201–11.
[30] Wauters G, Avesani V, Charlier J, Janssens M, Vaneechoutte M, Delmee M. Distribution of *Nocardia* species in clinical samples and their routine rapid identification in the laboratory. J Clin Microbiol 2005;43:2624–8.
[31] Ishikawa J, Yamashita A, Mikami Y, Hoshino Y, Kurita H, Hotta K, et al. The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:14925–30.
[32] Ishikawa J, Chiba K, Kurita H, Satoh H. Contribution of *rpoB2* RNA polymerase β subunit gene to rifampin resistance in *Nocardia* species. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1342–6.
[33] Vigliotta G, Tredici SM, Damiano F, Montinaro MR, Pulimeno R, di Summa R, et al. Natural merodiploidy involving duplicated *rpoB* alleles affects secondary metabolism in a producer actinomycete. Mol Microbiol 2005;55:396–412.
[34] Inaoka T, Takahashi K, Yada H, Yoshida M, Ochi K. RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3,3′-neotrehalosadiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. J Biol Chem 2004;279:3885–92.
[35] Newell KV, Thomas DP, Brrekasis D, Paget MS. The RNA polymerase-binding protein RbpA confers basal levels of rifampicin resistance on *Streptomyces coelicolor*. Mol Microbiol 2006;60:687–96.
[36] Hu Y, Mangan JA, Dhillon J, Sole KM, Mitchison DA, Butcher PD, et al. Detection of mRNA transcripts and active transcription in persistent *Mycobacterium tuberculosis* induced by exposure to rifampin or pyrazinamide. J Bacteriol 2000;182:6358–65.
[37] Pomerantz RT, O'Donnell M. The replisome uses mRNA as a primer after colliding with RNA polymerase. Nature 2008;456:762–6.
[38] Flåtten I, Morigen K, Morigen S, DnaA protein interacts with RNA polymerase and partially protects it from the effect of rifampicin. Mol Microbiol 2009;71:1018–30.
[39] Wegrzyn A, Szalewska-Palasz A, Blaszczak A, Liberek K, Wegrzyn G. Differential inhibition of transcription from sigma70- and sigma32-dependent promoters by rifampicin. FEBS Lett 1998;440:172–4.
[40] Vassylyev DG, Vassylyeva MN, Perederina A, Tahirov TH, Artsimovitch I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. Nature 2007;448:157–62.
[41] Imai T, Watanabe K, Mikami Y, Yazawa K, Ando A, Nagata Y, et al. Identification and characterization of a new intermediate in the ribosylative inactivation pathway of rifampin by *Mycobacterium smegmatis*. Microb Drug Resist 1999;5:259–64.
[42] Combrink KD, Denton DA, Harran S, Ma Z, Chapo K, Yan D, et al. New C25 carbamate rifamycin derivatives are resistant to inactivation by ADP-ribosyl transferases. Bioorg Med Chem Lett 2007;17:522–6.
[43] Dabbs E, Yazawa K, Tanaka Y, Mikami Y, Miyaji M, Andersen S, et al. Rifampicin inactivation by *Bacillus* species. J Antibiot (Tokyo) 1995;48:815–9.
[44] Tanaka Y, Yazawa K, Dabbs E, Nishikawa K, Komaki H, Mikami Y, et al. Different rifampicin inactivation mechanisms in *Nocardia* and related taxa. Microbiol Immunol 1996;40:1–4.
[45] Hui J, Gordon N, Kajioka R. Permeability barrier to rifampin in mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother 1977;11:773–9.
[46] Siddiqi N, Das R, Pathak N, Banerjee S, Ahmed N, Katoch VM, et al. *Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump. Infection 2004;32:109–11.
[47] Fernandes P, Ferreira BS, Cabral JMS. Solvent tolerance in bacteria: role of efflux pumps and cross-resistance with antibiotics. Int J Antimicrob Agents 2003;22:211–6.
[48] Maness M, Sparling P. Multiple antibiotic resistance due to a single mutation in *Neisseria gonorrhoeae*. J Infect Dis 1973;128:321–30.
[49] Hagman K, Pan W, Spratt B, Balthazar J, Judd R, Shafer W. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. Microbiology 1995;141:611–22.

Please cite this article in press as: Tupin A, et al. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. Int J Antimicrob Agents (2010), doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.017

Article n°2 publié dans Future Microbiol. en 2009

Myxopyronin: A punch in the jaws of the RNA polymerase

Audrey Tupin*†‡, Maxime Gualtieri*†‡, Konstantin Brodolin*†‡ and Jean-Paul Leonetti*†‡

*, Université Montpellier 1, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS)

† CNRS, UMR 5236, CPBS, 4 Bd Henri IV, CS 69033, F-34965 Montpellier, France

‡ Université Montpellier 2, CPBS, F-34095 Montpellier, France

*Correspondence should be addressed to J.P.L (jean-paul.leonetti@univ-montp1.fr) Phone: +33-467-548-607. Fax: +33-467-548-604.

Evaluation of: Belogurov G.A., Vassylyeva M.N., Sevostyanova A., *et al.*: Transcription inactivation through local refolding of the RNA polymerase structure. *Nature*, 457, 332-335 (2008).
Mukhopadhyay J., Das K., Ismail S., *et al.*: The RNA Polymerase "Switch Region" Is a Target for Inhibitors. *Cell*, 135, 295-307 (2008).

Bacterial RNA polymerase is an essential enzyme which is responsible for making RNA from a DNA template and is targeted by a number of antibiotics. The mechanism of action of two closely related transcription inhibitors, myxopyronin B and a synthetic analog desmethyl-myxopyronin was elucidated, together with the structures of the complexes. It revealed a new binding site and a new mechanism of action affecting the jaw domain of the enzyme. As the need for new antibiotics increase, these studies open new ways to the synthesis of more efficient analogs.

The growing challenge of antimicrobial resistance and scarcity of novel antibiotics available on the market underscore the need for new therapeutics. The discovery and study of an exotic organism, myxobacteria, within the last 20 years has supplied researchers with a major source of antibiotics including diverse transcription inhibitors [1]. Myxopyronin B (Myx), a secondary metabolite isolated from the myxobacteria *Myxococcus fulvus* [2], exhibits antibacterial activity against Gram-positive microorganisms. Other antibacterial members within the 3-acyl-4-hydroxy-a-pyronens class of natural products are also produced by myxobacteria (Corallopyronin A-C [3], Myxopyronin A).

Identifying the target of new antibiotics can be quite challenging in the antibiotic field. Fortunately, the target of Myx and Corallopyronin was rapidly identified to be the bacterial RNA polymerase (RNAP) [2, 3]. RNAP is a central enzyme in transcription and one of the most promising antibiotic targets. Rifampicin, the first transcription inhibitor used clinically, remains one of the most efficient anti-tubercular drugs to this day.

Despite its relatively low minimum inhibitory concentration [3, 4], Myx is not efficient enough for clinical use. However, the synthesis of Myx is feasible, unlike the majority of other natural transcription inhibitors. Myx is comprised of a pyrone core and two dienone and enecarbamate side chains. Initially, analogs [3, 4] were synthesized and evaluated for their *in vitro* antibacterial potency and their *in vitro* activity against RNAP. Most of the modifications of Myx had pronounced negative affects on the antibiotic's biological activity, except for the desmethyl-Myx (dMyx) analog whose activity against RNAP was increased threefold without affecting antibacterial activity when compared to Myx. Thus, the antimicrobial activity of Myx is highly sensitive to changes in the molecular structure. Further studies are needed to identify potential candidates for antibacterial therapy. For the synthesis of more efficient Myx analogs, the three-dimensional structure of the drug in complex with the target (RNAP) is required. This structure should be complemented with biochemical data detailing the transcription step that is disrupted by the drug.

Prokaryotic RNAP is a large protein comprised of core subunits ($\alpha(2)\beta\ \beta'$) and a σ factor that is required for promoter recognition and site-specific initiation of transcription. Interplay between the σ factor and the RNAP fine tunes gene expression. During transcriptional initiation, RNAP binds promoter DNA, forms a closed promoter complex that isomerises to the open the promoter complex through several intermediates (Figure 1). The isomerisation results in the melting (opening) of promoter DNA adjacent to the transcriptional start site. The open complex is then competent to initiate RNA synthesis in the presence of nucleotides. The RNAP cores and/or holoenzyme structures from *Thermus aquaticus* and

Thermus thermophilus have been solved at high resolution [5-7]. Crystal structures revealed that RNAP is shaped as a crab claw, the pincers (or jaw) formed by the largest subunits β and β'. To initiate transcription, promoter DNA must enter deep into the cleft formed by the mobile clamp domain (formed mainly by the β'-jaw) and β-jaw (Figure 1).

Unlike Rifampicin, which inhibits synthesis of RNA chains longer than 2-3 nt, Myx blocks RNA synthesis completely [8], suggesting an effect on an early transcription initiation step or the catalytic reaction. Two groups [9, 10] have recently attempted to understand how this inhibitor works by using a combination of genetic, biochemical and structural approaches. These groups have solved the structure between the *T. aquaticus* RNA polymerase and dMyx [9] or –Myx [10]. In both cases, the Myx molecule was shown to bind in the pocket deep inside the RNAP clamp head domain, the domain that forms crucial contacts with the DNA template strand in the elongation complex. To define the residues essential for holding Myx at the binding site, mutational analyses were performed. Among the determinants conferring resistance to Myx, the β' K345, β E1279 and β S1322 (*E. coli* numbering) residues were specified in both studies. Interestingly, all of the identified Myx resistant substitutions involve residues that are conserved in bacterial RNAP, although some are not conserved between bacterial and eukaryotic RNAP. Consistent with this observation, Myx does not inhibit eukaryotic enzymes. Furthermore, the structure shows that Myx interacts primarily with the residues of the switch-2 region and acts as a "hinge" that controls the movement of the clamp domain [10]. Both studies revealed no serious dMyx or Myx-induced alterations in the structure of the holoenzyme. The primary alteration was the refolding of the β' switch-2-segment in the dMyx-RNAP complex. Indeed, substitutions or deletions of residues that stabilize the original switch-2 conformation confer resistance to the antibiotic, whereas substitution or deletion of residues favoring refolding confers hypersensitivity to dMyx (Belogurov). These data suggest that refolding is necessary to open the dMyx-binding site.

X-ray crystallization of the Myx-RNAP complex elucidated the binding site of Myx and the basis of resistance but did not given any further information on which step of transcription is affected. To further explore the mechanism of Myx action, the authors used a set of biochemical approaches.

Both articles [9, 10] showed that the action of Myx exhibits an order-of-addition dependence, as Myx and dMyx block transcription only when added prior to the promoter DNA. These data suggest that Myx acts at the early step of initiation – likely the promoter complex formation.

However, the hypothesized molecular mechanisms differ between the papers. This discrepancy can be explained by differences in the inhibitor structure (-dMyx versus –Myx) or the techniques used [e.g. non-equilibrium conditions (mobility shift experiments [10]) versus equilibrium conditions (footprinting, using of competitor heparin [9])].

Footprinting experiments by Belogurov et al. [9] show that dMyx does not inhibit the interaction of RNAP with the λP_R promoter or the nucleation of promoter melting. However, the dMyx stabilized switch-2 refolding, may prevent the formation of contacts between RNAP and the DNA template strand and result in inhibitions of DNA melting beyond the register -3. Thus, melting of the transcriptional start site (position +1) and formation of a transcriptionally active open promoter complex is suppressed. Interestingly, this open complex was sensitive to heparin in the presence of dMyx. Formation of the unstable open complexes with similar biochemical properties was observed in the case of RNAP with mutations in the β subunit [11]. These complexes might represent transient intermediates along the pathway to an active open complex. However, additional studies are necessary to validate this hypothesis.

The principal conclusion of the Belogurov et al. paper [9] is that dMyc functions through stabilization of switch-2 refolding, which subsequently blocks crucial interactions with the DNA, preventing correct positioning of downstream DNA (-3 to +15) and propagation of promoter melting.

Mukhopadhyay et al. [10] used a slightly different approach with electrophoretic mobility-shift experiments on the lacUV5 promoter and its derivatives. Using this system, they showed that Myx inhibits formation of a stable RNAP-promoter open complex in the presence of heparin. This inhibition is observed with different promoters and requires the switch region, as several mutations in the RNAP abrogate the inhibition. However, Myx was unable to inhibit formation of a stable complex with truncated promoters lacking the downstream positions -11 to + 15, a promoter segment that binds to the active-center cleft. Placement of this segment is likely to be affected by the opening or closing of the clamp. Mukhopadhyay et al. [10] suggest that Myx binds to the RNAP switch region, a hinge that mediates opening and closing of the RNAP clamp. The mechanism favored in this article is an allosteric effect of Myx that locks the clamp into a closed or partially closed state. Thus, the downstream DNA segment (positions -11 to +15) cannot enter the RNAP cleft. Interestingly, the same target and mechanism of action was found for Corallopyronin [3], a α-pyron antibiotic structurally related to Myx, and Ripostatin [12], a polyketide-derives macrocylic-lactone antibiotic structurally unrelated to Myx.

There is extensive convergence between the results of these two independent studies [9, 10] with some differences in the interpretation of the mechanism. Both papers agree on the binding sites of Myx, but the difficulty in solving the molecular mechanism of transcription initiation is complex and results in disparate proposed mechanisms between these two groups. To reconcile these two models, one interpretation may be that Myx induces a localized conformation change of the β' switch that allows the formation of an unstable open complex. This could explain why a promoter complex was observed under footprinting conditions and why the same complex was not seen in a mobility shift assay after equilibrium rupture. The clash or the contacts missing between the polymerase and the downstream promoter elements would inhibit a conformation change necessary to the formation of a transcriptionally active open promoter complex. Clearly, Myx binds to a domain involved in opening and closing the RNAP clamp. The opening of RNAP allows DNA access to the catalytic sites, and its closing allows DNA to stabilize the polymerase on its template. It is tempting to speculate that Myx affects clamp opening or closing, influencing the stabilization of the enzyme on its promoter as suggested by Mukhopadhyay et al. [10]. Whether Myx locks the clamp in a partially closed conformation that does not accommodate upstream DNA elements, or whether Myx locks the clamp in an open conformation that cannot lock the enzyme on its template is unclear. However, one cannot rule out the possibility that Myx only inhibits the extension of the open complex to +1 and that the effects on the clamp is only a consequence of this inhibition and not the cause.

Natural antibiotics targeting transcription are very often relatively high molecular weight molecules with complex structures (for a review see [13]). Rifampicin is a semisynthetic compound derived from *Nocardia mediterranei* with a large cyclic structure, making it difficult to synthesize. MccJ25 is a dodecapeptide with an unusual cyclic ternary structure, and lipiarmycin an antibiotic in phase III clinical trial is a rather complex macrocyclic antibiotic. Therefore, Myx is one of only a very few transcription inhibitors whose total synthesis is achievable. Mukhopadhyay et al. [10] have already identified additional pockets proximal to the Myx binding site that could be used to create new analogs with higher affinities for their target and, thus, increased efficacy. There is no doubt that these two structures will give valuable information and will stimulate the medical chemist to rationally design new analogs.

Bibloography

1. Reichenbach H.: Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J Ind Microbiol Biotechnol.*, 27, 149-56 (2001).
2. Irschik H., Gerth K., Höfle G., *et al.*: The myxopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from Myxococcus fulvus (Myxobacterales). *J Antibiot (Tokyo).* 36, 1651-8 (1983).
3. Irschik H., Jansen R., Höfle G., *et al.*: The corallopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from Myxobacteria. *J Antibiot (Tokyo).* 38, 145-52. (1985).
4. Lira R., Xiang A.X., Doundoulakis T., *et al.*: Syntheses of novel myxopyronin B analogs as potential inhibitors of bacterial RNA polymerase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 6797 (2007).
5. Murakami K.S., Masuda S.Darst S.A.: Structural Basis of Transcription Initiation: RNA Polymerase Holoenzyme at 4 A Resolution. *Science*, 296, 1280-1284 (2002).
6. Zhang G., Campbell E., Minakhin L., *et al.*: Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 A resolution. *cell*, 98, 811-24 (1999).
7. Vassylyev D.G., Sekine S.-i., Laptenko O., *et al.*: Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6[thinsp]A resolution. *Nature*, 417, 712 (2002).
8. McClure W.R.Cech C.L.: On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, 253, 8949-8956 (1978).
9. Belogurov G.A., Vassylyeva M.N., Sevostyanova A., *et al.*: Transcription inactivation through local refolding of the RNA polymerase structure. *Nature*, 457, 332-335 (2008).
10. Mukhopadhyay J., Das K., Ismail S., *et al.*: The RNA Polymerase "Switch Region" Is a Target for Inhibitors. *Cell*, 135, 295-307 (2008).
11. Nechaev S., Chlenov M.Severinov K.: Dissection of Two Hallmarks of the Open Promoter Complex by Mutation in an RNA Polymerase Core Subunit. *J. Biol. Chem.*, 275, 25516-25522 (2000).
12. Irschik H., Augustiniak H., Gerth K., *et al.*: The ripostatins, novel inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *J Antibiot (Tokyo).* 48, 787-92 (1995).
13. Villain-Guillot P., Bastide L., Gualtieri M., *et al.*: Progress in targeting bacterial transcription. *Drug Discovery Today*, 12, 200 (2007).

Executive Summary

Objective of this study

- Myxopyronin is an antibiotic inhibiting bacterial transcription. The first objective is to solve the structure of the complex myxopyronin-RNA polymerase.
- To understand the mechanism of action of Myxopyronin.

Methods

- X-ray crystallization of the Myx-RNAP complex.
- Enzymology including transcription experiments, footprinting.

Conclusion

- X-ray crystallization of the complex reveled the binding site of Myx and its action on the jaw domain of the RNA polymerase.

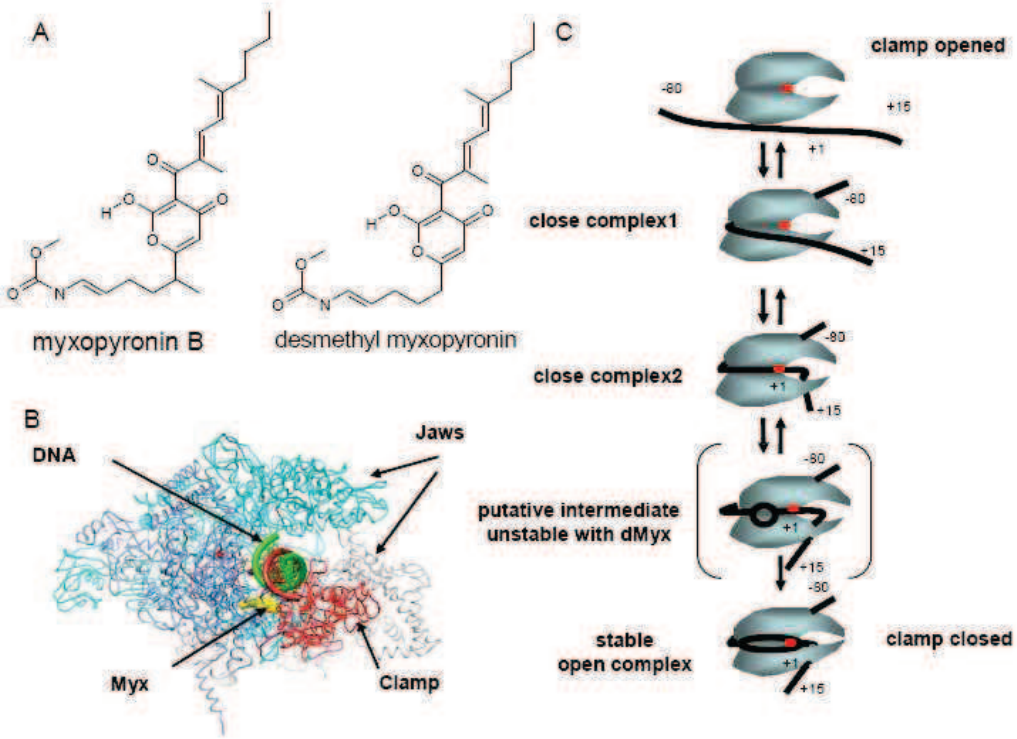


Figure 1 The Bacterial RNA polymerase and its inhibitors.

(A) Structure of myxopyronin and desmethyl-myxopyronin. (B) Structure of the bacterial RNA polymerase and location of the jaws and clamp domains. (C) The steps of transcription initiation and the putative mechanism of action of myxopyronin.

CHAPITRE II – RÉSULTATS

A. Introduction

Dans la lutte contre la résistance bactérienne il est primordial de trouver régulièrement de nouveaux antibiotiques. Bien qu'au cours des dernières années le développement du criblage à haut débit ait orienté la recherche de nouveaux antibiotiques vers des molécules synthétiques, la grande majorité des molécules connues actuellement sont d'origine naturelle. Ces antibiotiques naturels ont l'avantage de présenter une grande diversité de structure et, étant utilisées par les microorganismes *in vivo*, de déjà posséder un grand nombre des propriétés requises d'un bon candidat utilisable en thérapie. Parmi ces molécules, nous nous intéressons à celles qui ciblent l'ARNP. Le chapitre « Les inhibiteurs de l'ARN polymérase » de l'introduction de cette thèse décrit ces inhibiteurs. Or, le mécanisme d'action de certaines molécules décrites comme étant des inhibiteurs de l'ARNP dès les années 1950 ou les années qui ont suivies, n'a toujours pas été élucidé.

La lipiarmycine est un macrolide décrit pour la première fois en 1975 (Parenti, J. Antibiot., 1975 ; Sergio, J. Antibiot., 1975 ; Coronelli, J. Antibiot., 1975). Elle est active contre un large spectre de bactéries à Gram-positif dont *C. difficile* (en essais cliniques de phase III sous le nom d'OPT-80, Optimer Pharmaceuticals, Par-101, Pharmaceuticals) responsable de la plupart des diarrhées d'origine nososcomiale et provoquant un fort taux de mortalité en Amérique du Nord et en Europe. Actuellement, le traitement de première ligne pour ce type d'infection implique la vancomycine ou la metronidazole. Même si l'utilisation de ces traitements n'est pas encore remise en cause, une diminution de leur efficacité a été observée. L'OPT-80 est entré en essai clinique de phase III en 2007, il présente l'avantage d'être peu ou pas absorbable de façon systémique, en adéquation avec son action dans les intestins, d'être très efficace contre les bactéries ciblées (CMI ~0,5µg/ml sur *C. difficile*), et, contrairement à la vancomycine, de ne pas agir contre la flore intestinale (Gerber, Expert Opin. Investig. Drugs, 2008). La lipiarmycine est également en essai clinique de phase II pour le traitement de souches d'*E. faecalis* résistantes à la vancomycine, le troisième pathogène nosocomial le plus fréquent dans le monde. La lipiarmycine montre aussi une bonne efficacité *in vitro* contre des souches de *M. tuberculosis* résistantes à la rifampicine avec une fréquence de mutations conférant des résistances (~1 pour 10^8 cellules/ml) inférieure à celle trouvée pour la rifampicine (Kurabachew, J. Antimicrob. Chemother., 2008).

Les premières études ont montré que, comme la rifampicine, la lipiarmycine inhiberait l'étape d'initiation de la transcription mais, qu'à la différence de celle-ci, son action ne porterait que sur la transcription dépendante du facteur σ. En effet, la molécule est inactive sur la transcription assurée par le core seul (Sergio, J. Antibiot., 1975 ; Sonenshein, J. Bacteriol., 1977 ; Sonenshein, J. Mol. Biol., 1979). L'hypothèse de la dépendance au facteur σ a été renforcée par une étude publiée

en 1980 (Osburne, J. Virol., 1980) montrant que la lipiarmycine inhibait la transcription précoce du phage SPO1 mais n'avait aucune action sur les transcriptions moyenne et tardive. La transcription du phage SPO1 reste sensible à la rifampicine 5 min après être devenue résistante à la lipiarmycine, ce qui suggère un mécanisme d'action différent entre la lipiarmycine et la rifampicine. Or, la transcription précoce est dirigée par l'holoenzyme de l'hôte bactérien (*B. subtilis*), la transcription moyenne par le core de l'hôte et la protéine du phage gp28, et la transcription tardive par le core de l'hôte et les protéines gp33 et gp34 du phage tenant lieu du facteur σ. Ces résultats semblent donc indiquer que la différence de sensibilité est due à la variation des protéines jouant le rôle de facteur σ. Dans ce cas, la lipiarmycine serait le premier représentant connu d'inhibiteurs de l'ARNP présentant une dépendance au facteur σ, ce qui constitue un nouveau mécanisme d'action. Cette propriété pourrait également être intéressante dans la perspective de recherche d'inhibiteurs capables d'agir sélectivement sur les bactéries persistantes.

Dans cette thèse, je me suis donc attachée à déterminer le mécanisme d'action de la lipiarmycine. L'étude de ce mécanisme est importante à plusieurs niveaux. Sur le plan fondamental, pour la compréhension fine du rôle des différents domaines de l'ARNP dans les différentes étapes de la transcription, ainsi qu'en tant que modèle afin de comprendre comment une molécule peut agir sélectivement sur certains facteurs σ. Et, sur le plan pharmacologique afin de déterminer les modifications de structure à apporter à la molécule pour renforcer son action et sélectionner d'autres inhibiteurs actifs sur les bactéries persistantes.

B. Résultats

B.I) Détermination du site de liaison de la lipiarmycine

La détermination du mécanisme d'action de la lipiarmycine passe, dans un premier temps, par la résolution de son site de liaison.

Par la sélection de mutants de *B. subtilis* résistants à la lipiarmycine, une étude publiée en 1977 (Sonenshein, J. Bacteriol., 1977) a confirmée que la lipiarmycine agissait sur la transcription en interagissant avec l'ARNP. Des tests de transcription *in vitro* utilisant des core enzymes purifiés à partir de souches sensibles ou résistantes à la lipiarmycine ont montré que les mutations conférant des résistances à la lipiarmycine sont localisées sur au moins une des sous-unités constituant le core enzyme. La cartographie génétique de ces mutations par des expériences de transformation de l'ADN de souches résistantes a montré qu'elles étaient localisées entre les clusters de mutations

conférant une résistance à la rifampicine et à la streptolydigine, sur les gènes *rpoB* (rifampicine) et *rpoC* (streptolydigine) **(figure 32)**.

Afin de localiser précisément ces mutations sur les gènes de *B. subtilis*, une amplification par PCR des régions situées entre les loci déterminant la résistance à la rifampicine et à la streptolydigine a été effectuée sur des souches résistantes à la lipiarmycine. Le séquençage des régions amplifiées a révélé une mutation ponctuelle de l'acide aminé R326→L codé par le gène *rpoC*. Par analogie avec la structure de l'holoenzyme de *T. aquaticus* décrite en 2002 (Murakami, Science, 2002a) cette mutation a été positionnée à proximité de la région 3.2 de σ, impliquant un nouveau site de liaison (Gualtieri, Antimicrob. Agents Chemother., 2006).

L'analyse de 18 souches de *M. tuberculosis* résistantes à la lipiarmycine a permis de déterminer 4 autres points de mutations, deux points sur RpoB (nommée Q1048 dans l'article mais qui correspond à Q1054 sur la séquence *de M. tuberculosis* et V1117 dans l'article mais qui correspond à V1123 sur la séquence) et 2 autres sur RpoC (P326 et R412). Ces mutations sont localisées dans des régions de haute homologie entre les ARNPs des différents organismes. Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas de résistance croisée entre les mutations conférant des résistances à la lipiarmycine et celles conférant des résistances à la rifampicine (Kurabachew, J. Antimicrob. Chermother., 2008). Ces données confirment l'hypothèse de deux sites de liaison distincts pour les deux molécules (Sonenshein, J. Bacteriol., 1977).

Afin de définir plus précisément le site de liaison de la lipiarmycine nous avons isolé des mutants spontanés dérivés de trois souches de référence (DSMZ, OG1RF et V583) d'*E. faecalis* et résistants à 500 µg/ml de lipiarmycine. La détermination des CMI a montré que 14 souches résistantes présentaient une CMI ~ 1 mg/ml. Ces mutants ont ensuite été caractérisés génotypiquement par séquençage partiel des gènes *rpoB* et *rpoC*. Cette étude a révélé la présence de quatre points de mutations, dont deux sont équivalents à ceux trouvés chez *M. tuberculosis* (V1129 chez *E. faecali*s V583 correspondant à V1117 chez *M. tuberculosis*, et Q1060 chez *E. faecalis* V583 correspondant à Q1048 chez *M. tuberculosis*), et deux qui n'avaient jamais encore été rapporté: V1106 sur RpoB et R89 sur RpoC **(article n°3)**.

Les structure de l'ARNP de *T. aquaticus* et de *T. thermophilus* étant les seules disponibles actuellement, nous avons fait un alignement de séquences des protéines RpoB et RpoC de *B. subtilis*, *E. faecalis*, *M. tuberculosis*, *E. coli* et *T. thermophilus* afin de positionner les différentes mutations sur la structure de l'ARNP chez *T. thermophilus*.

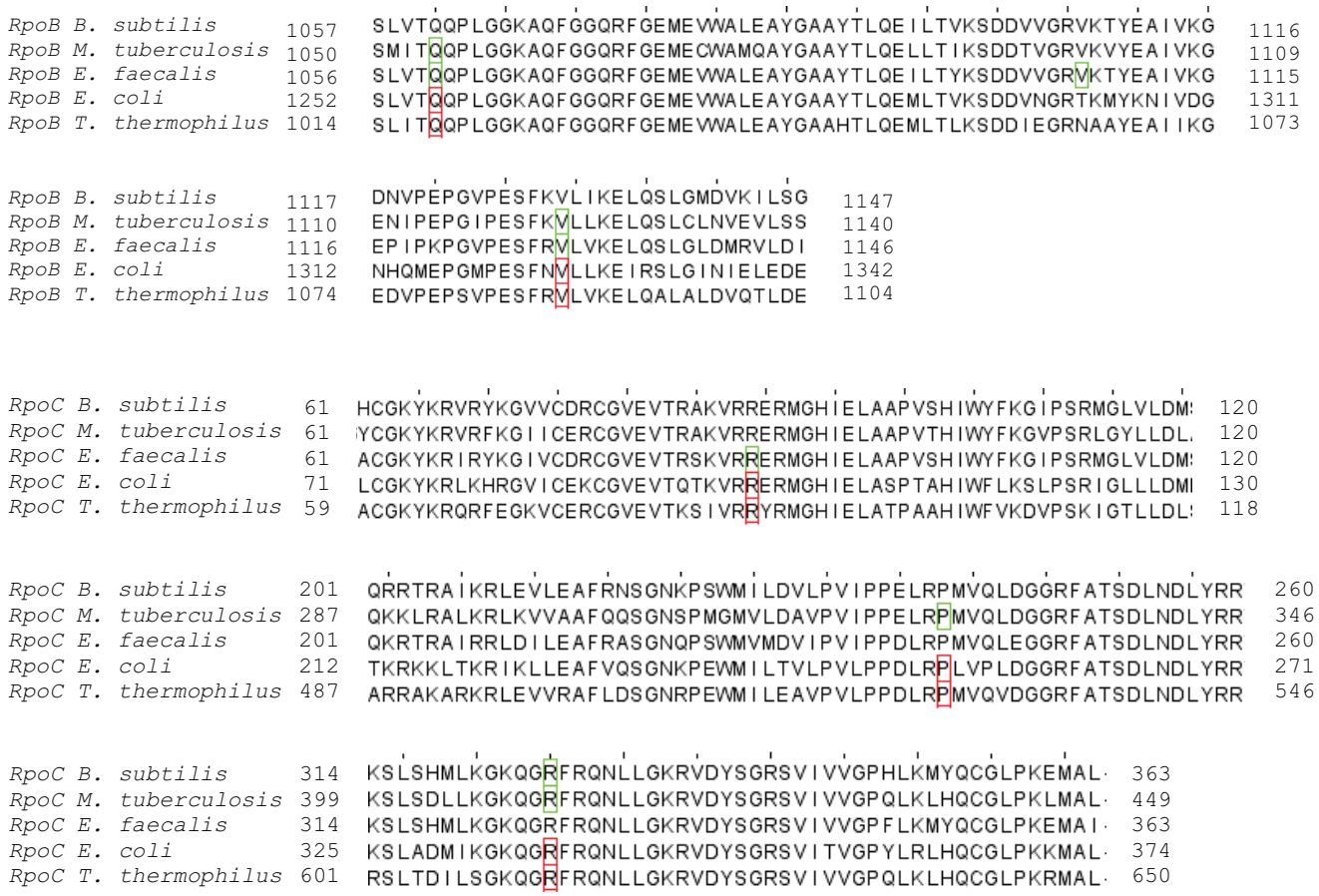


Figure 31 : Alignement des séquences de RpoB et RpoC montrant la conservation des mutations conférant des résistances à la lipiarmycine chez *B. subtilis*, *M. tuberculosis*, *E. faecalis*, *E. coli*, et *T. thermophilus*. Les cadres verts désignent les résidus mutés décrits dans les publications citées, et les cadres rouges désignent la correspondance de ces résidus sur la séquence de *T. thermophilus* et d'*E. coli*.

Cet alignement confirme qu'à l'exception de V1106 chez *E. faecalis*, la plupart des résidus mutés conférant des résistances à la lipiarmycine et trouvés chez les différentes bactéries étudiées, sont conservés entre les différentes bactéries, et notamment chez *T. thermophilus* dont l'ARNP est utilisé pour des études structurales. Cette conservation laisse penser que ces mutations affectent des résidus constituant le site de liaison de la lipiarmycine.

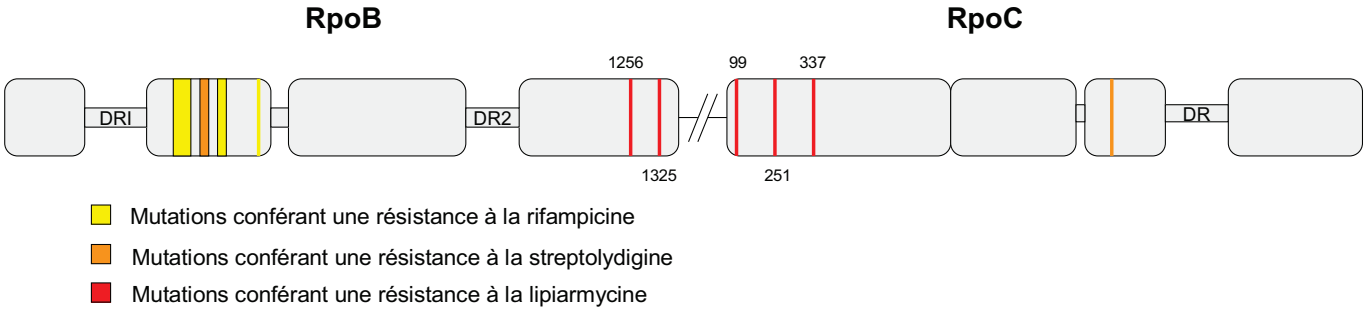


Figure 32 : Positionnement des mutations conférant des résistances à la rifampicine, à la

streptolydigine et à la lipiarmycine sur RpoB et RpoC chez *E. coli* (Figure réalisée d'après les résultats publiés par Sonenshein, J. Bacteriol., 1977 ; Gualtieri, Antimicrob. Agents Chemother., 2006 ; Kurabachew, J. Antimicrob. Chemother., 2008 ; article n°3).

Les mutations sont localisées au niveau de la partie C-terminal de la sous-unité β (à proximité du segment I) et de la partie N-terminal de la sous-unité β' (segments A, B et C).

Cette étude a révélé que la lipiarmycine ciblait différents éléments du domaine « clamp » ou en contact avec le « clamp » : le β' « Zn-finger » (R87 chez *T. thermophilus*), le β' « lid » (P526 chez *T. thermophilus*), et le résidu V1087 (*T. thermophilus*) dans le « clamp », et les β' « switch-2 » (R613 chez *T. thermophilus*) et β « switch-3 » (R1018 chez *T. thermophilus*) qui connectent le core au reste de l'ARNP **(figure 1B de l'article n°4**, figure33**)**. Elle confirme que le site de liaison de la lipiarmycine est distinct de celui de la rifampicine et qu'il est localisé dans une région différente. En effet, les différents éléments ciblés par la molécule se trouvent à proximité du canal de sortie de l'ARN. A partir de ces données nous pouvons formuler deux hypothèses :

- la lipiarmycine affecte la fonction des différents éléments constituant son site de liaison.
- la lipiarmycine interfère avec l'extension du brin d'ARN au niveau de l'étape d'initiation.

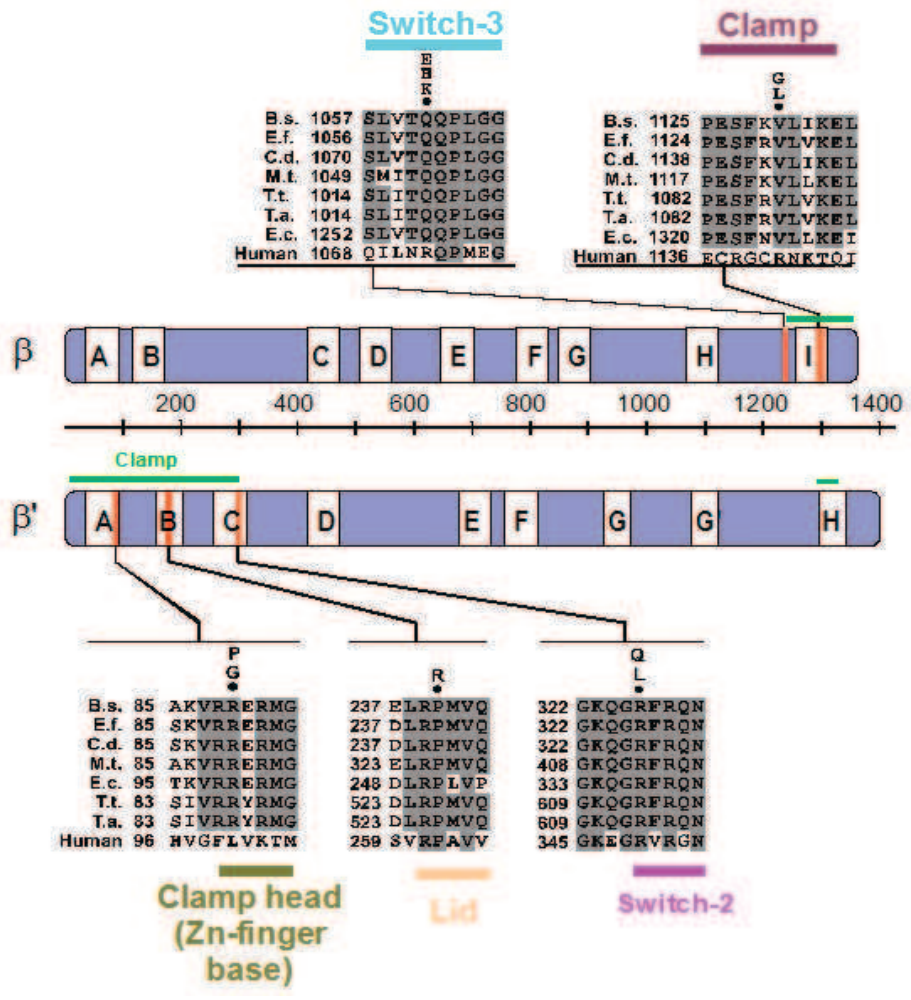


Figure 33 : Localisation des mutations conférant des résistances à la lipiarmycine sur les différents domaines de l'ARNP.

Le site de liaison putatif de la lipiarmycine chevauche celui d'autres molécules dont le mécanisme d'action a été récemment élucidé, la myxopyronine, la ripostatine et la corallopyronine. Nous pouvons donc émettre deux autres hypothèses qui sont :

- il existe une résistance croisée partielle entre la lipiarmycine et ces antibiotiques.
- la lipiarmycine partagerait le même mécanisme d'action que ces antibiotiques ou aurait un mécanisme d'action très proche.

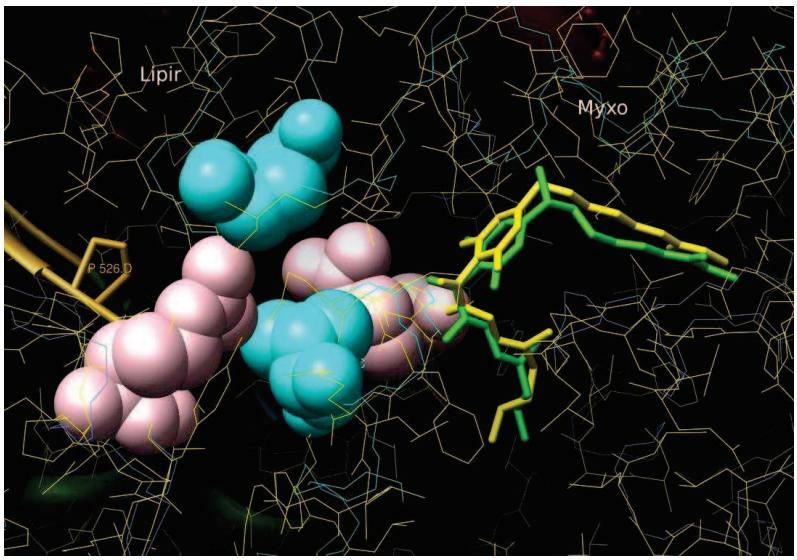


Figure 34 : Modélisation structurale des sites de liaison de la lipiarmycine et de la myxopyronine définis par les résidus dont la mutation confère des résistances à ces antibiotiques. Lipir : lipiarmycine, Myxo : myxopyronine.

B.II) Détermination du mécanisme d'action de la lipiarmycine.

Afin de déterminer précisément le mécanisme d'action de la lipiarmycine il est nécessaire de résoudre la structure du complexe ARNP-lipiarmycine par cristallographie. Or, les seuls modèles structuraux disponibles actuellement sont les ARNPs de *T. aquaticus* et de *T. thermophilus.* Malheureusement, un test de transcription *in vitro* a montré que ces enzymes sont résistantes à la lipiarmycine ce qui limite la possibilité d'une étude cristallographique **(figure supplémentaire 2A, B de l'article n°4)**. Nous avons donc utilisé des approches génétiques et biochimiques en présence de l'ARNP d'*E. coli* qui est sensible à la lipiarmycine.

B.II)1. La lipiarmycine agit avant la première étape catalytique

Dans un premier temps, il était nécessaire de vérifier l'hypothèse publiée par Sonenshein *et al.* (Sonenshein, J. Mol. Biol., 1979) suggérant que la lipiarmycine agirait sur l'initiation de la transcription en inhibant la formation de la première liaison phosphodiester. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de transcription *in vitro* en présence d'un fragment du promoteur T7A1. Cette expérience a montré que l'addition d'UTP radiomarqué en position +2 était inhibée en présence de lipiarmycine, ce qui suggère que la lipiarmycine agirait dès la formation de la première liaison phosphodiester, en accord avec les résultats rapportés par Sonenshein *et al.* (Sonenshein, J. Mol. Biol., 1979) **(figure 2A de l'article n°4)**. Mais, les tests de transcription effectués sur le fragment de promoteur *lac*UV5 en présence d'une amorce ApA complémentaire aux positions +1 et +2 du promoteur n'annule pas l'effet inhibiteur de la lipiarmycine, contrairement aux résultats attendus si la molécule agissait sur la formation de la première liaison phosphodiester **(figure 2B de l'article n°4)**. Ces résultats suggèrent donc que la lipiarmycine agit avant la première étape catalytique.

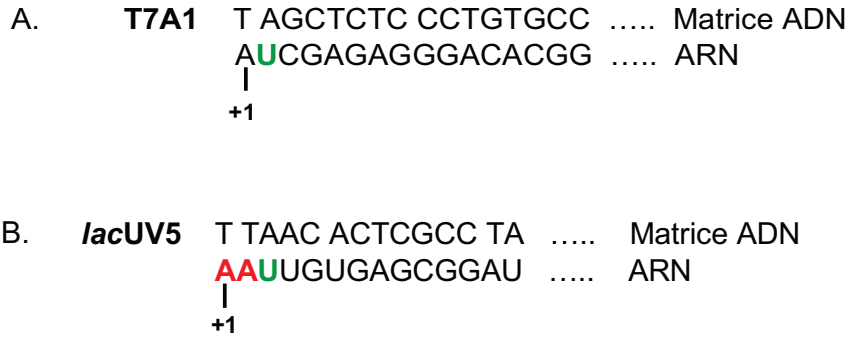


Figure 35 : A. Séquence d'un fragment du promoteur T7A1 à partir de la position +1. Le nucléotide en vert représente le premier UTP radiomarqué incorporé dans l'ARN lors des expériences de transcription *in vitro*. B. Séquence d'un fragment du promoteur *lac*UV5 à partir de la position +1. Les nucléotides en rouge représentent l'amorce ARN ApA complémentaire des positions +1 et +2 du promoteur, utilisé dans l'expérience de transcription *in vitro*.

L'une des hypothèses formulées à partir de la détermination du site de liaison de la molécule est que celle-ci pourrait affecter la fonction des différents éléments constituant ce site. Nous avons voulu vérifier cette assertion. Pour cela, nous nous sommes concentrés sur un élément en particulier, l'élément « switch-2 ».

B.II)2. Rôle de l'élément « switch-2 »

L'élément « switch-2 », ainsi que les autres éléments « switch », relie le « clamp » au reste du core (Cramer, Science, 2001 ; Murakami, Science, 2002a, b). Il couplerait le mouvement du « clamp » et la fermeture du canal principal autour de l'ADN avec la liaison de celui-ci au core (Cramer, Science, 2001 ; Gnatt, Science, 2001). « Switch-2 » possède plusieurs résidus chargés hautement conservés, K334, R337, R339, K345, R346 et R352 (numérotation d'*E. coli*) dont certains contactent le brin matrice de l'ADN, et notamment de la position -1 à la position +2, près du site actif. La liaison de l'élément « switch-2 » au brin matrice est essentiel à la séparation des deux brins d'ADN pendant l'élongation (Naji, Nucleic Acids Res., 2008). La mutation de plusieurs résidus au niveau de cet élément diminue la stabilité des complexes ouverts (Belogurov, Nature, 2009 ; Pupov, Nucleic Acids Res., 2010). Un groupe d'antibiotiques, la myxopyronine, la corallopyronine et la ripostatine (Mukhopadhyay, Cell, 2008 ; Belogurov, Nature, 2009), cible l'élément « switch-2 » et affecte sa fonction en stabilisant sa forme inactive. L'élément « switch-2 » pourrait alterner entre différentes conformations. La substitution R339A, localisée dans la région du « switch-2 » soumise aux changements de conformation, bloque la propagation de la fusion de l'ADN au-delà de la position -3 (Pupov, Nucleic Acides Res., 2010), de manière comparable à l'effet observé en présence de myxopyronine (Belogurov, Nature, 2009). Or, la myxopyronine et la lipiarmycine ont des sites de liaison chevauchants qui contactent l'élément « switch-2 ». L'utilisation en transcription *in vitro* d'un mutant de l'ARNP portant la substitution R337A (*E. coli*; R613 pour *T. thermophilus*) au niveau de cet élément montre que celui-ci est plus résistant à un gradient de lipiarmycine que l'ARNP sauvage **(figure 3A de l'article n°4)**. En effet, l'IC_{50} obtenue en présence de l'ARNP sauvage est estimée à ~ 15 µM alors que l'IC_{50} obtenue en présence de la mutation R337A est estimée à ~ 168 µM. En remplaçant une charge positive (R) par une charge neutre (A), la substitution pourrait diminuer l'affinité de la molécule pour son site de liaison. On note également que l'effet de la mutation R337A est différent de celui rapporté pour R339A. Cette différence pourrait être expliquée par l'absence de contact direct entre le résidu R337 et l'ADN, contrairement au résidu R339.

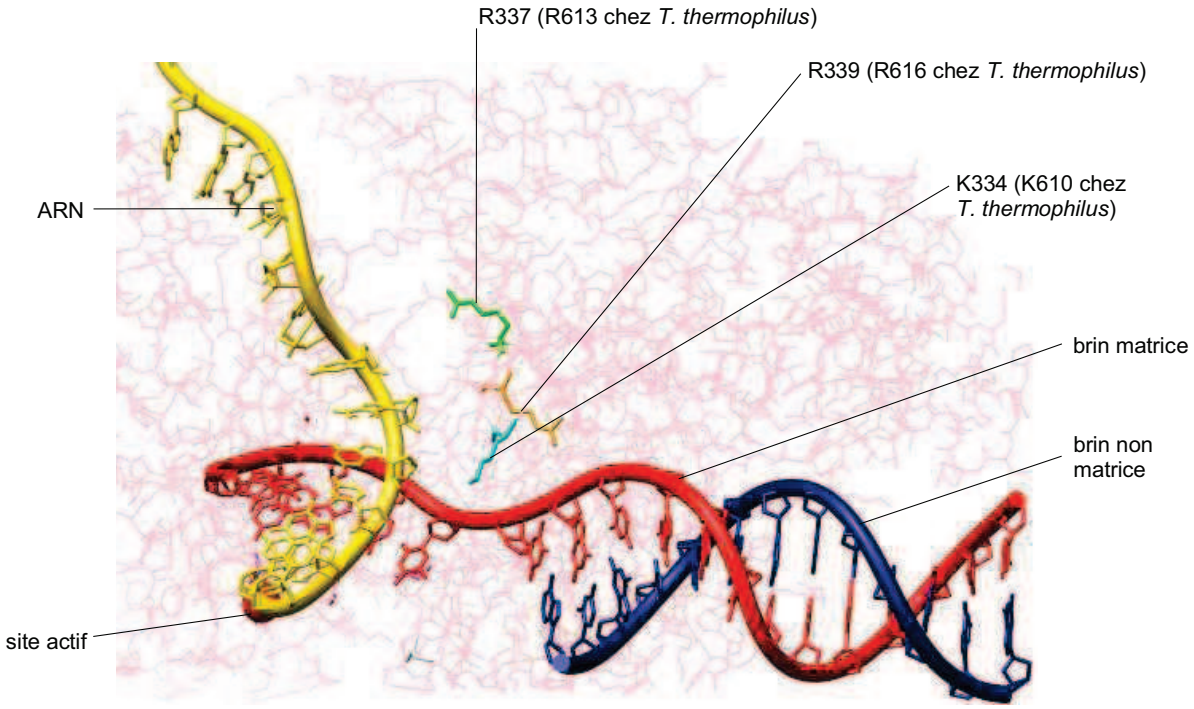


Figure 36 : Modélisation des contacts formés entre les résidus K334, R337 et R339 et le brin matrice d'ADN.

L'effet de la lipiarmycine semble également plus ou moins fort selon le promoteur utilisé. En effet, sur le promoteur stable λP_R l'inhibition de la transcription est moins importante que sur le promoteur *lac*UV5 (résultats préliminaires non montrés). Ces résultats suggèrent que la lipiarmycine pourrait avoir un effet dépendant du promoteur, mais d'autres expériences sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Par son contrôle de l'ouverture et de la fermeture du « clamp », l'élément « switch-2 » contrôle le positionnement correct de l'ADN au niveau du site actif (Naji, Nucleic Acids Res.,2008 ; Belogurov, Nature, 2009 ; Pupov, Nucleic Acids Res., 2010). Cette étape est nécessaire à la fusion de l'ADN au niveau du site d'initiation de la transcription. Nous émettons donc l'hypothèse que la lipiarmycine affecte cette fonction de l'élément « switch-2 ».

B.II)3. Effet de la lipiarmycine sur la fusion de l'ADN

Si la lipiarmycine affecte la fonction de l'élément « switch-2 », elle doit, en conséquence, inhiber la formation du complexe ouvert. Des expériences de EMSA (Electromobility Shift Assay) effectuées en présence et en absence du compétiteur héparine, sur un fragment du promoteur *lac*UV5 indiquent que la molécule n'a pas d'effet sur la formation du complexe fermé, mais qu'elle

agirait à une étape ultérieure puisqu'elle inhibe la formation de complexe stables, résistant à l'héparine (RPi et RPo) (**figure 4B de l'article n°4**). On note également que dans les mêmes conditions, mais en présence de la mutation R337A, la formation des complexes stables est très faiblement inhibée par la lipiarmycine. Des expériences de footprint en présence de KMnO4, reproduites sur différents promoteurs (*lac*UV5, λP_R et *gal*P2), confirment que la formation du complexe ouvert est inhibée en présence de lipiarmycine et cela dès le début de la formation du complexe aux alentours de la position -11. Encore une fois, l'effet de la lipiarmycine est aboli en présence de la mutation R337A **(figure 4C et figure supplémentaire 4A, B de l'article n°4)**. La lipiarmycine bloquerait donc l'isomérisation du complexe intermédiaire en complexe ouvert. Ces résultats diffèrent avec le mécanisme d'action rapporté pour la myxopyronine qui empêche la propagation de la fusion au-delà de la position –3, agissant ainsi à une étape ultérieure. Ces résultats démontrent donc que la lipiarmycine présente un nouveau mécanisme d'action, non encore rapporté à ce jour.

Lors de la formation du complexe ouvert, l'ADN aval doit entrer au niveau du canal principal et interagir avec les différents domaines de l'ARNP présents dans ce canal afin de former la bulle de transcription. Lors de cette transition, la lipiarmycine pourrait donc agir à deux niveaux : (i) en empêchant l'entrée de la partie avale l'ADN dans le canal du site actif, ou, (ii) à une étape ultérieure, en empêchant la formation de contacts stables entre l'ADN et les domaines responsables de la formation du complexe ouvert, notamment l'élément « switch-2 ». Des expériences de footprint à la DNase I et à l'exonucléase III menées sur un fragment des promoteurs *lac*UV5 et λP_R, en présence et en absence de lipiarmycine, montrent que les interactions entre l'ADN aval et l'ARNP sont légèrement déstabilisées en présence de lipiarmycine mais que cette partie de l'ADN reste protégée par l'ARNP, démontrant que la lipiarmycine n'empêche pas l'entrée de la partie avale de l'ADN dans le canal principal **(figure 4D, E et figures supplémentaires 4C et 5A, B de l'article n°4)**. Une fois encore ces résultats diffèrent avec ceux rapportés pour la myxopyronine dans l'étude de Mukhopadhyay *et al*., qui empêcherait l'entrée de la partie avale de l'ADN dans le canal du site actif (Mukhopadhyay, Cell, 2008). Dans le cas de la lipiarmycine, l'effet inhibiteur de la molécule serait dû à la déstabilisation de la liaison entre l'ADN aval et le « clamp » de l'ARNP. Lors de l'isomérisation du complexe intermédiaire en complexe ouvert les deux brins d'ADN se séparent et se réhybrident de manière transitoire. L'interaction du brin matrice avec le domaine « clamp » maintiendrait les deux brins séparés de manière stable et permettrait le positionnement correct du brin matrice au niveau du site actif.

Le scaffold est un ADN double brin synthétique, ne contenant pas de séquence promotrice, qui mime l'ADN aval dans l'ARNP (positions -8 à +11 pour le brin matrice et positions +3 à +11

pour le brin non matrice) en s'affranchissant de toute interaction ARNP-ADN en amont.

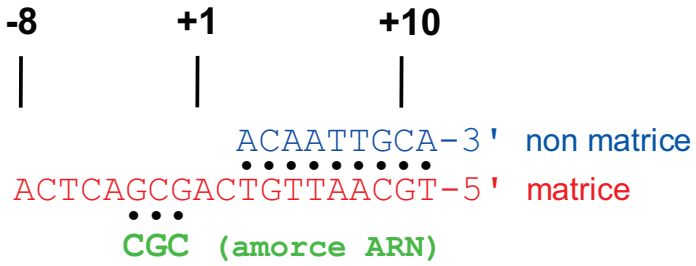


Figure 37 : Structure du scaffold utilisé dans l'article n°4. L'amorce ARN permet d'initier la transcription en absence de séquence promotrice.

Son utilisation permet d'étudier, de manière isolée, l'effet de la lipiarmycine sur les interactions entre l'ARNP et la partie avale de l'ADN. Des expériences de transcription *in vitro* montrent que la lipiarmycine est plus active en présence d'ADN simple brin qu'en présence du scaffold **(figure 5B, D de l'article n°4)**. Encore une fois, ces résultats sont en défaveur de l'hypothèse de la fermeture du « clamp » qui empêcherait l'entrée de l'ADN au niveau du canal du site actif. Par contre, le scaffold occupe tout l'espace disponible dans le canal du site actif, contrairement à l'ADN simple brin, favorisant les interactions entre l'ARNP et l'ADN. En conséquence, ces résultats indiquent que les interactions entre l'ARNP et l'ADN aval antagonisent l'effet inhibiteur de la lipiarmycine en stabilisant le complexe. Ceci est en corrélation avec le modèle structural du complexe ARNP-scaffold (Vassylyev, Nature, 2007) qui suggère que l'interaction entre l'ARNP et les six premiers nucléotides de l'hybride ARN-ADN contient la plupart des contacts nécessaires à la stabilisation du complexe d'élongation. Comme suggéré plus haut, la stabilisation de ces interactions devrait donc supprimer l'effet inhibiteur de la lipiarmycine. L'utilisation d'amorces ARN de taille croissante montre en effet que l'inhibition de la transcription par la lipiarmycine est empêchée en présence d'amorces ARN d'une longueur de 7 nt et de 13 nt, confirmant l'effet antagoniste de la stabilisation des interactions **(figure 5E et figure supplémentaire 6C, D de l'article n°4)**. Des expériences de cross-link et de EMSA, pratiquées en parallèle sur le scaffold, confirment que la lipiarmycine abolit les interactions entre l'ADN aval et les sous-unités β et β' de l'ARNP sans affecter la stabilité globale du complexe, indiquant que l'ADN aval est présent dans le canal du site actif mais qu'il n'est pas correctement positionné **(figure 6A, B de l'article n°4)**.

En conclusion, le positionnement incorrect du brin matrice au niveau du site actif affaiblirait

les interactions entre l'ADN et les sous-unités β et β' du core de l'ARNP, empêchant la formation d'un complexe ouvert stable compétant pour la transcription. La lipiarmycine ciblerait donc la transition entre le RPi et le RPo.

Plusieurs résultats suggèrent fortement que l'élément « switch-2 » est la cible principale de la lipiarmycine, qui affecterait sa fonction :

- La caractérisation d'une mutation conférant une résistance à la lipiarmycine au niveau de l'élément « switch-2 » (R337 chez *E. coli*, R613 chez *T. thermophilus*).
- L'effet démontré de la lipiarmycine sur le positionnement correct du brin matrice d'ADN au niveau du site actif. Cette étape est dirigée par l'élément « switch-2 » (Naji, Nucleic Acids Res., 2008 ; Pupov, Nucleic Acids Res., 2010).
- La résistance de l'ARNP portant la mutation R337A aux effets inhibiteurs de la lipiarmycine sur la transcription et sur la formation du complexe ouvert.
- L'inhibition de la transcription sur le scaffold mimant l'ADN aval, qui est indépendante des autres éléments du « clamp ». En effet, du fait de leur localisation, les autres éléments du « clamp » constituant le site de liaison de la lipiarmycine n'interagissent pas avec cette partie de l'ADN. De plus, des études ont montré que le « Zn-finger » ne jouait pas de rôle dans la stabilisation du complexe (King, J. Mol. Biol, 2004), qu'une délétion dans le domaine « lid » n'avait pas d'effet sur la fusion de l'ADN bien qu'il semble être nécessaire à la formation de complexes ouverts stables (Naryskhina, J. Mol. Biol., 2006 ; Toulokhonov, J. Mol. Biol., 2006), et que l'élément « switch-3 » serait plutôt impliqué dans la maintenance de l'hybride ARN-ADN dans le complexe d'élongation (Kent, J. Biol. Chem., 2009).

B.II)4. Rôle de la région 3.2 de σ et de ses interactions avec l'élément « switch2 »

La modélisation du site de liaison de la lipiarmycine sur l'ARNP de *T. thermophilus* montre que celui-ci est localisé à proximité de la région 3.2 de σ. En conséquence, cette région pourrait contribuer à la formation du site de liaison de la lipiarmycine. En effet, des résultats d'expériences de transcription *in vitro* sur un fragment du promoteur *lac*UV5 vont dans le sens de cette hypothèse puisqu'un mutant de σ délété de l'extrémité de la boucle de la région 3.2, constituant la partie contactant le site de liaison de la lipiarmycine, rend l'ARNP résistante à cet inhibiteur **(figure 3C, D de l'article n°4)**. L'effet inhibiteur de la lipiarmycine requière donc l'intégrité de la région 3.2 de σ.

L'initiation de la transcription sur le scaffold montre que le core est moins sensible à l'effet de la lipiarmycine que l'holoenzyme **(figure 5B, D de l'article n°4)**. Des résultats similaires ont été rapportés par Sonenshein *et al.* (Sonenshein, J. Bacteriol, 1977 ; Sonenshein, J. Mol. Biol., 1979). Pourtant, même si la présence du facteur σ n'est pas indispensable à l'initiation de la transcription sur le scaffold, car l'ADN synthétique ne contient pas de régions promotrices, la présence de σ^{70} favorise la transcription en absence de lipiarmycine (Sonenshein, J. Mol. biol., 1979, **figure 5B de l'article n°4**). Donc, la première hypothèse formulée sur l'implication de $\sigma_{3.2}$ dans le mécanisme d'action de la lipiarmycine serait que, même si $\sigma_{3.2}$ ne constitue pas en lui-même le site de liaison de la lipiarmycine, il pourrait favoriser sa formation de manière directe ou indirecte.

La région 3.2 de σ est particulièrement variable entre les différents facteurs σ alternatifs et les différentes espèces bactériennes, et un certains nombre de facteurs σ n'en possèdent pas. La proximité de cette région avec le site de liaison de la lipiarmycine pourrait expliquer la dépendance au facteur σ rapportée précédemment pour la transcription précoce et tardive des gènes du phage SPO1 (Osburne, J. Virol., 1980). Nous pouvons donc imaginer que l'effet de la lipiarmycine varie en fonction des différents facteurs σ associés au core de l'ARNP.



Figure 38 : Alignement des séquences de la région 3.2 de σ chez *E. coli* et *B. subtilis* et des protéines gp33, gp34 et gp28 chez le bactériophage SPO1.

L'effet de la région 3.2 de σ sur l'inhibition de la transcription en présence de lipiarmycine n'est pas clairement défini. La délétion de la région 3.2 n'affecte pas directement la stabilité de l'ADN aval et la fusion de l'ADN (Kulbachinskiy, J. Biol. Chem., 2006), suggérant que l'effet de cette région est indirect. La modélisation des mutations conférant des résistances à la lipiarmycine sur la structure de l'ARNP de *T. thermophilus* et des études structurales (Vassylyev, Nature, 2007a) montrent que cette région contacte l'élément « switch-2 » et le brin matrice d'ADN. Cette observation nous conduit à formuler une deuxième hypothèse concernant l'implication de $\sigma_{3.2}$ dans le mécanisme d'action de la lipiarmycine : $\sigma_{3.2}$ pourrait moduler la fonction de la région « switch-2 » dans le positionnement correct du brin matrice au niveau du site actif. L'élément « switch-2 » existant sous plusieurs conformations (Belogurov, Nature, 2009), l'effet de la région 3.2 sur le positionnement du brin matrice pourrait se faire de manière indirecte via la stabilisation de l'élément « switch-2 » dans sa conformation active. En outre, la région 3.2 de σ est nécessaire à la

synthèse d'amorces ARN de façon indépendante du promoteur (Zenkin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004). Et, même si cette région ne contacte pas directement le site de liaison des NTPs, elle agirait en stabilisant le deuxième nucléotide lors de la formation de la première liaison phosphodiester (Kulbachinskiy, J. Biol. Chem., 2006). Or, l'élément « switch-2 » contacte l'ADN au niveau de la position -1 dans le complexe d'élongation procaryote (Vassylyev, Nature, 2007a, b). Ces deux domaines sont donc très proches l'un de l'autre, pouvant ainsi créer un réseau d'interactions allostériques aboutissant à la stabilisation du brin matrice au niveau du site actif. L'élément « switch-2 » a également été impliqué dans la stimulation de la liaison des nucléotides initiateurs (Pupov, Nucleic Acids Res., 2010). Il est donc possible que la stabilisation du brin matrice favorise la formation de la première liaison phosphodiester. Lorsqu'un fragment ARN d'une taille suffisante (~ 7 nt) a été synthétisé, stabilisant le complexe, la fonction des régions « switch-2 » et 3.2 de σ n'est plus nécessaire et la lipiarmycine n'a plus d'effet inhibiteur **(figure 5E et figure supplémentaire 6C, D de l'article n°4)**.

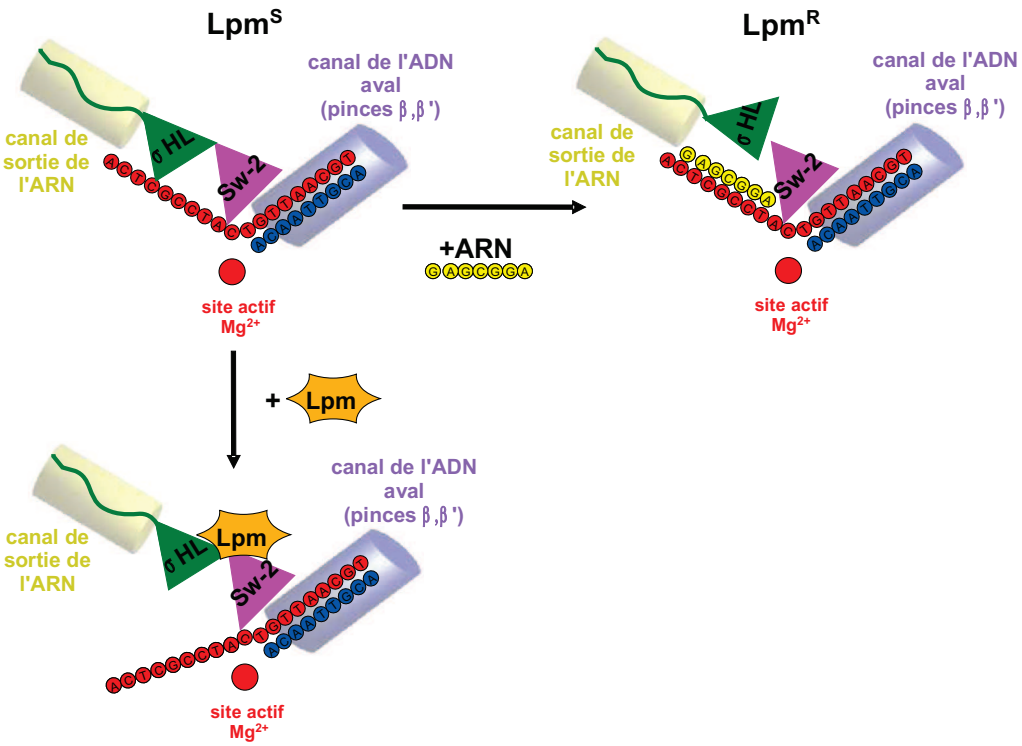


Figure 39 : Modèle du mécanisme d'action de la lipiarmycine. Sw-2 : « switch-2 », σHL : boucle de la région 3.2 de σ, Lpm : lipiarmycine.

C. Conclusion

L'étude du mécanisme d'action effectué dans cette étude a permis d'établir plusieurs conclusions majeures :

- La lipiarmycine agit sur la transcription par un nouveau mécanisme d'action.
- La lipiarmycine inhibe la transcription en bloquant complètement l'ouverture du promoteur.
- L'élément β' « switch-2 » contribue certainement au mécanisme d'action de la lipiarmycine, et, l'effet inhibiteur de la lipiarmycine requière l'intégrité de la région 3.2 de σ^{70}.
- L'effet de la lipiarmycine pourrait donc être dépendant de σ, en accord avec des études précédentes (Osburne, J. Virol., 1980) et dépendant du promoteur.
- L'utilisation du modèle scaffold permet l'analyse de l'inhibition de la transcription de façon promoteur indépendante.

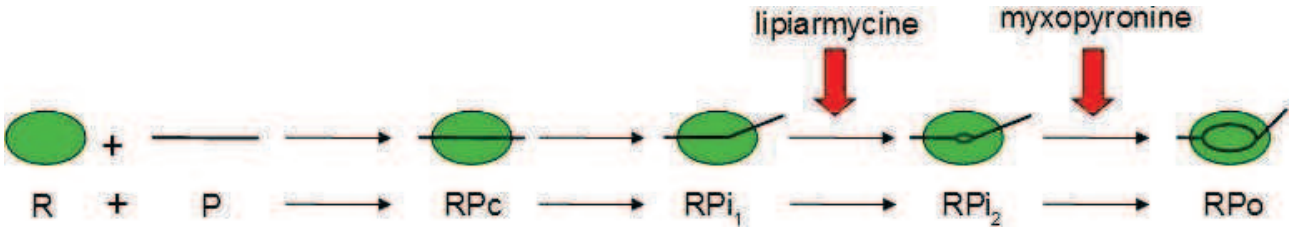


Figure 40 : Étapes ciblées par la lipiarmycine et la myxopyronine dans la voie de formation d'un complexe ouvert.

D. Perspectives

Dans cette étude, nous avons déterminé que la lipiarmycine bloquait la transition RPi → RPo et qu'elle agissait avant la myxopyronine dans la voie de formation du complexe ouvert. Or, plusieurs intermédiaires conformationnels constituent cette voie, et la compréhension fine du mécanisme d'action de la molécule requière la détermination précise du complexe intermédiaire ciblé. Nous envisageons donc de réaliser des expériences de footprint en temps réel afin de caractériser cet intermédiaire (Brenowitz, Curr. Opin. Struct. Biol., 2002 ; Sclavi, Proc. Natl. Acad.

Sci. USA, 2005).

Actuellement, la résistance des modèles structuraux disponibles (ARNP de *T. aquaticus* et de *T. thermophilus*) à la lipiarmycine limite la possibilité d'exploiter des résultats qui seraient obtenus à partir de la cristallisation du complexe ARNP-lipiarmycine. Aucune équipe n'a encore réussi à cristalliser l'ARNP d'*E. coli* qui est sensible à la molécule. Afin de déterminer précisément le mécanisme d'action et les transitions structurales impliquées, il est nécessaire de trouver un nouveau modèle sensible à la lipiarmycine et cristallisable. *Deinococcus radiodurans* est une bactérie phylogénétiquement proche de la famille des *Thermus* et qui est sensible à l'action de la lipiarmycine, cependant, à notre connaissance aucune tentative de cristallisation n'a été faite sur cette enzyme. L'alignement de séquences de RpoC chez *E. coli*, *B. subtilis*, *M. tuberculosis*, *E. faecalis*, *C. difficile*, *T. aquaticus* et *T. thermophilus* montre des différences d'acides aminés au niveau du « clamp » : un résidu E (position 100 chez *E. coli*) présent chez les bactéries sensibles à la lipiarmycine est remplacé par un résidu Y chez les bactéries résistantes, et un résidu K (position 96 chez *E. coli*) est remplacé par I. Il serait intéressant de déterminer si la mutation de ces résidus chez *T. thermophilus* ou *T. aquaticus* rend les bactéries sensibles à la molécule, en quel cas, la cristallisation du complexe serait rendue possible.

Du fait de la proximité des sites de liaisons de la lipiarmycine et de la myxopyronine, nous nous sommes concentrés dans cette étude, sur l'effet de la lipiarmycine sur l'élément « switch-2 ». Mais, l'étude des mutations conférant une résistance à la lipiarmycine a montré que d'autres éléments du core étaient ciblés par la molécule. C'est le cas des β' « lid », β' « Zn-finger » et du β « switch-3 ». Tous sont localisés au niveau du domaine mobile « clamp » dont l'ouverture et la fermeture contrôle le positionnement de l'ADN dans le canal principal. Des ARNPs portant les mutations conférant une résistance à la lipiarmycine, R99G (« Zn-finger »), P251R (« lid »), et K334A (« switch-2 ») ont été produites par mutagénèse dirigée. La mutation Q1256K sera produite prochainement. Nous allons étudier l'effet de ces mutations sur la fusion de l'ADN et sur l'initiation de la transcription en présence et en absence de lipiarmycine.

Les résultats de l'étude menée sur la transcription du phage SPO1 (Osburne, J. Virol., 1980), l'effet préférentiel de la lipiarmycine sur l'holoenzyme (Sonenshein, J. Bacteriol., 1977 ; Sonenshein, J. Mol. Biol., 1979 ; **figure 5B de l'article n°4**), et la nécessité de la présence de la région 3.2 pour l'inhibition de la transcription nous conduisent à penser que l'effet inhibiteur de la lipiarmycine présenterait une dépendance au facteur σ. En particulier, la région 3.2 de σ^{70} est très variable et est absente de certains groupes de facteurs σ. Il serait donc intéressant de tester l'effet de la lipiarmycine sur la transcription en présence de différents facteurs σ présentant une variation de la région 3.2.

E. Articles n°3 et 4

Article n°3

GModel
ANTAGE-3085; No. of Pages 2
ARTICLE IN PRESS
International Journal of Antimicrobial Agents xxx (2009) xxx–xxx
Contents lists available at ScienceDirect
International Journal of Antimicrobial Agents
journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Letter to the Editor

Frequency and characterisation of spontaneous lipiarmycin-resistant *Enterococcus faecalis* mutants selected in vitro

Sir,

Enterococci are the third to fourth most prevalent nosocomial pathogen worldwide. An increasing number of isolates have acquired resistance to penicillin/ampicillin, aminoglycosides (high-level) and/or vancomycin. For such isolates, the therapeutic spectrum is limited to molecules introduced recently into clinical practice, e.g. quinupristin/dalfopristin, linezolid, tigecycline and daptomycin. However, resistance to these drugs has already been reported and biopharmaceutical companies have developed the next generation of antibiotics, e.g. lipiarmycin.

Lipiarmycin, also known as tiacumicin B, clostomicin or OPT-80, is an antibiotic in clinical development for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea (Phase III clinical) and the prevention of vancomycin-resistant *Enterococcus* infection (Phase I clinical) [1]. The molecule also has excellent bactericidal activity against *Mycobacterium tuberculosis*, and *M. tuberculosis* strains resistant to standard antituberculosis drugs are not cross-resistant to lipiarmycin [2].

Lipiarmycin targets the bacterial RNA polymerase at a different domain from that targeted by rifampicin. Indeed, *rpoB* and *rpoC* mutations conferring lipiarmycin resistance in *Bacillus subtilis* and *M. tuberculosis* are clustered in the proximity of the RNA exit channel [2–5]. We aimed to generate lipiarmycin-resistant *Enterococcus faecalis* strains derived from three different reference strains in order



Fig. 1. Partial amino acid sequences of the *rpoB* and *rpoC* regions of *Enterococcus faecalis* V583 (Ef), *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mt) and *Bacillus subtilis* 168 (Bs). Residues of *rpoB* or *rpoC* involved in lipiarmycin resistance are highlighted in grey. Amino acid changes found in resistant isolates are indicated by (▼) for *E. faecalis*, (■) for *M. tuberculosis* and (♦) for *B. subtilis*.

0924-8579/$ – see front matter © 2009 Published by Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy.
doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.07.003

Please cite this article in press as: Gualtieri M, et al. Frequency and characterisation of spontaneous lipiarmycin-resistant *Enterococcus faecalis* mutants selected in vitro. Int J Antimicrob Agents (2009), doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.07.003

to determine the frequency of spontaneous resistance in vitro and to identify associated mutations.

Lipiarmycin was produced and purified by fermentation of *Actinoplanes deccanensis* (DSMZ 43806) using the method of Talpaert et al. [5]. Mutant strains were isolated as spontaneous variants that were able to form colonies on Todd–Hewitt agar in the presence of lipiarmycin (500 μg/mL). The strains of *E. faecalis* used were: DSMZ 2570, which does not harbour a plasmid; OG1RF (ATCC 700802, kind gift of H. Hirt) harbouring the pheromone-inducible plasmid pCF10; and the clinical strain V583, a vancomycin-resistant strain harbouring the plasmids pTEF1, pTEF2 and pTEF3. Surprisingly, the frequency of spontaneous lipiarmycin resistance was high ($4.58 \pm 0.59 \times 10^{-6}$) for *E. faecalis* V583 and was ca. 100 times lower for *E. faecalis* OG1RF ($4.37 \pm 0.88 \times 10^{-8}$). No mutants were obtained from *E. faecalis* DSMZ 2570 ($>10^{-9}$). Eight *E. faecalis* OG1RF mutants and six *E. faecalis* V583 mutants were characterised by antibiotic susceptibility testing using the broth microdilution method in 96-well microtitre plates, as described by National Committee for Clinical Laboratory Standards guidelines [6]. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of the 14 lipiarmycin-resistant strains were >1 mg/mL, whereas all parent strains had MIC values ranging from 8 μg/mL to 16 μg/mL. The MIC of seven other commercial antibiotics was measured and this level of resistance was specific for lipiarmycin (data not shown). Genotypic characterisation of the lipiarmycin-resistant strains was performed by partial DNA sequencing of the *rpoB* and *rpoC* genes [2,3]. Two sets of primers were selected on the basis of the *E. faecalis* V583 genome sequence [6]: primers 1A (5′-TTAGTCTCTGTCTTCGGCTG) and 1B (5′-CACGAAGGAGATAAAATGGC) that amplify a portion of *rpoB*; and primers 2A (5′ATACGAGCTTCTGCTTGTGCTTCTT) and 2B (5′-TTGATCGATGTAAATAAATTCGA) that amplify a portion of *rpoC*. Sequence analyses of 14 of the lipiarmycin-resistant clones of OG1RF and V583 revealed single mutations located in *rpoB* [V_{1129}L (GTA/TTA), V_{1129}G (GTA/GGA) and Q_{1060}K (CAA/AAA)] of OG1RF and in *rpoC* [R_{89}P (CGT/CCT), R_{89}G (CGT/GGT)] and *rpoB* [V_{1106}E (GTG/GAG)] of V583. All of these mutations (Fig. 1) are clustered in the RNA exit channel, as expected based on previous reports [2,3]. Mutations conferring lipiarmycin resistance in OG1RF were identical to mutations reported by Kurabachew et al. [2] in *M. tuberculosis* (Fig. 1), whereas the mutations detected in *E. faecalis* V583 are novel.

In conclusion, the *rpoB* V1106E, *rpoC* R89G and *rpoC* R89P mutations found in six *E. faecalis* V583 strains have not been reported previously. Our results also identify major differences in the propensity of different *E. faecalis* strains to generate spontaneous lipiarmycin-resistant mutants.

Acknowledgment

The authors thank Helmut Hirt for the gift of *E. faecalis* OG1RF (pCF10).

Funding: This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). AT is a Fellow from CNRS and the region Languedoc-Roussillon; KB is a Fellow from the RTRS Infectiopôle Sud.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

[1] Johnson A. Drug evaluation: OPT-80, a narrow-spectrum macrocyclic antibiotic. Curr Opin Investig Drugs 2007;8:168–73.
[2] Kurabachew M, Lu SHJ, Krastel P, Schmitt EK, Suresh BL, Goh A, et al. Lipiarmycin targets RNA polymerase and has good activity against multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Antimicrob Chemother 2008;62:713–9.
[3] Gualtieri M, Villain-Guillot P, Latouche J, Leonetti JP, Bastide L. Mutation in the *Bacillus subtilis* RNA polymerase β′ subunit confers resistance to lipiarmycin. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:401–2.
[4] Russell AD, Chopra I. Understanding antibacterial action and resistance (Ellis Horwood Series in Pharmaceutical Technology). Letchworth, UK: Ellis Horwood; 1996.
[5] Talpaert M, Campagnari F, Clerici L. Lipiarmycin: an antibiotic inhibiting nucleic acid polymerases. Biochem Biophys Res Commun 1975;63:328–34.
[6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 6th ed. Document M07-A6. Villanova, PA: NCCLS; 2003.

Maxime Gualtieri[a,b]
Audrey Tupin[a,b]
Konstantin Brodolin[a,b]
Jean-Paul Leonetti[a,b,*]
[a] *Université de Montpellier 1, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS), CNRS, UMR 5236, CPBS, 4 Bd Henri IV, CS 69033, F-34965 Montpellier, France*
[b] *Université de Montpellier 2, CPBS, F-34095 Montpellier, France*

* Corresponding author. Tel.: +33 467 548 607; fax: +33 467 548 604.
E-mail address: jean-paul.leonetti@univ-montp1.fr (J.-P. Leonetti)

Please cite this article in press as: Gualtieri M, et al. Frequency and characterisation of spontaneous lipiarmycin-resistant *Enterococcus faecalis* mutants selected in vitro. Int J Antimicrob Agents (2009), doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.07.003

The transcription inhibitor Lipiarmycin blocks DNA fitting into the RNA polymerase catalytic site

Audrey Tupin[1,2,3], Maxime Gualtieri[1,2,3], Jean-Paul Leonetti[1,2,3] and Konstantin Brodolin[1,2,3*]

[1]Université Montpellier 1, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS)

[2]CNRS, UMR 5236, CPBS, 4 Bd Henri IV, CS 69033, F-34965 Montpellier, France

[3]Université Montpellier 2, CPBS, F-34095 Montpellier, France

*Corresponding author: konstantin.brodolin@univ-montp1.fr

Running Title: Lipiarmycin inhibits template fitting

Subject category: *Chromatin & Transcription; Microbiology & Pathogens*

Character count: 48721

ABSTRACT

Worldwide spreading of drug-resistant pathogens makes mechanistic understanding of antibiotic action an urgent task. The macrocyclic antibiotic Lipiarmycin (Lpm), which is under development for clinical use, inhibits bacterial RNA polymerase (RNAP) by an unknown mechanism. Using genetic and biochemical approaches, we show that Lpm targets the σ^{70} subunit region 3.2 and the RNAP β' subunit switch-2 element, which controls the clamping of promoter DNA in the RNAP active-site cleft. Lpm abolishes isomerization of the "closed" promoter complex to the transcriptionally competent "open" complex and blocks σ^{70}-stimulated RNA synthesis on promoter-less DNA templates. Lpm activity decreases when the template DNA strand is stabilized at the active site through the interaction of RNAP with the nascent RNA chain. Template DNA strand fitting into the RNAP active-site cleft directed by the β' subunit switch-2 element and the σ^{70} subunit region 3.2 is essential for promoter melting and for *de novo* initiation of RNA synthesis, and our results suggest that Lpm impedes this process.

Keywords: lipiarmycin/RNA polymerase/sigma region 3.2/switch region/antibiotic resistance

INTRODUCTION

DNA-dependent RNA polymerase (RNAP) is an essential enzyme for gene expression in living organisms from all kingdoms of life. The bacterial RNAP holoenzyme consists of a catalytic core (composed of subunits 2α,β,β', and ω) and a σ subunit required for promoter recognition, promoter opening and transcription initiation (Gross et al., 1998; Helmann and deHaseth, 1999). Structural studies have revealed that the β' and β subunits of the RNAP core form the pincers (or jaws) of a crab claw–like structure in which the active site is buried deeply in the cleft between the jaws (Zhang et al., 1999). The mobile clamp domain, formed mainly by the β' subunit pincer, serves as a lock of the active-site cleft and a docking site for the σ subunit. In the elongation complex, the 8 to 9 bp DNA-RNA hybrid occupies the RNAP active-site cleft, whereas the ~15 bp DNA duplex downstream of the start site (downstream DNA) is fixed by the pincers in the downstream channel (Vassylyev et al., 2007). The nascent RNA chain exits the active-site cleft through the RNA exit channel formed by the elements of the β' clamp and β subunit. The σ subunit region 3.2 forms a linker between the σ regions 2 and 4 that fills the RNA exit channel in the holoenzyme (Murakami et al., 2002a; Vassylyev et al., 2002). The linker is ejected out of the channel as soon as 10 to 11 nucleotides of RNA are formed.

In *Escherichia coli* the σ^{70} subunit is responsible for transcription initiation for most promoters during exponential growth. During promoter recognition, evolutionarily conserved regions 2 and 4 of σ^{70} bind the -10 and -35 elements of the promoter, respectively; this interaction leads to the formation of the initial "closed" promoter complex. Initiation of RNA synthesis requires the formation of the "open" promoter complex, in which ~13 bp of promoter DNA around the transcription start site are melted to form a transcription bubble. The transition from the "closed" to "open" promoter complex includes several intermediates and proceeds through

nucleation of melting in the –10 element, followed by the downstream propagation of the transcription bubble towards and beyond the transcription start site (Buc and McClure, 1985; Rogozina et al., 2009; Schroeder et al., 2009; Sclavi et al., 2005; Spassky et al., 1985).

Structural and biochemical data suggest that full open-complex formation requires clamping of the downstream part of the promoter DNA duplex (positions -5 to + 20) by the RNAP β' clamp and β pincer (Craig et al., 1998; Murakami et al., 2002b; Sclavi et al., 2005). The β' switch-2 element, which links the clamp domain to the RNAP body, likely plays a key role in the positioning of template DNA in the RNAP active site (Cramer et al., 2001; Naji et al., 2008). Recently, the β' switch-2 element was shown to be a target for the antibiotic myxopyronin, which prevents melting of the promoter transcription start site and consequently inhibits transcription (Belogurov et al., 2009; Mukhopadhyay et al., 2008).

Transcription inhibitors are of great interest as tools to dissect the molecular mechanisms of transcription initiation and elongation. Also, RNAP, a target for a large body of antibiotics, remains an attractive target for antibacterial drug discovery (Villain-Guillot et al., 2007). Currently, rifamycins (rifampicin and its analogs) remain a first line of antibiotic treatment for tuberculosis and are the only clinical inhibitors targeting RNAP. However, use of rifampicin is strongly compromised now because of the spread of resistant forms of bacteria. For this reason, discovery of new inhibitors and their targets has become an urgent goal in medical research.

After rifampicin, the second inhibitor of RNAP proposed for use in the clinic is lipiarmycin (Lpm) (**Figure 1A**). This drug is a narrow-spectrum, macrocyclic antibiotic produced by *Actinoplanes deccanensis* (Coronelli et al., 1975). Lpm (also known as: tiacumicin B, OPT-80, or PAR-101) is currently in phase III clinical trials against *Clostridium difficile* infections and has been shown to be effective against rifampicin-resistant forms of *Mycobacterium tuberculosis* (Kurabachew et al., 2008). The mechanism of Lpm action is not understood. It was suggested that Lpm does not affect promoter binding but instead blocks the formation of the first phosphodiester

bond during the initiation of RNA synthesis (Sonenshein and Alexander, 1979). Also, it was shown that the σ-like factors of SP01 bacteriophage make *B. subtilis* RNAP resistant to Lpm (Osburne and Sonenshein, 1980).

The probable binding site for Lpm on the RNAP surface can be defined by the location of amino acid changes that confer resistance in *B. subtilis* (Gualtieri et al., 2006; Sonenshein et al., 1977), *M. tuberculosis* (Kurabachew et al., 2008) and *E. faecalis* (Gualtieri et al., 2009). The Lpm^R substitutions, which mapped exclusively in the β and β' subunits, are clustered at the N-terminal region of the β' subunit (comprising evolutionarily conserved regions A, B, and C) and the C-terminal region of the β subunit in proximity to region I (**Figure S1**). Positioning of the Lpm^R mutations on the *Thermus thermophilus* RNAP structure revealed that the antibiotic targets several functional elements of the RNAP mobile clamp domain: the β' subunit Zn-finger (*E.coli* $R^{99} \rightarrow$ P,G), β' Lid (*E.coli* $P^{251} \rightarrow$ R), β' switch-2 (*E.coli* $R^{337} \rightarrow$ L,Q) and β switch-3 (*E.coli* $Q^{1256} \rightarrow$ K,H,E) (**Figure 1B**). The β' subunit Zn-finger and the β' Lid are located in the "clamp core" close to the RNA exit channel, whereas the β' switch-2 and β switch-3 connect the clamp to the RNAP body (Cramer et al., 2001; Murakami et al., 2002a; Murakami et al., 2002b). Potentially, Lpm could affect the function of any of these elements during transcription initiation or could interfere with the growing RNA chain. Characterizing the structure of the RNAP-Lpm complex is necessary to fully understand the mechanism of inhibition. However, transcription experiments have shown that *Thermus* RNAPs, the only existing models suitable for structural studies, are resistant to Lpm (**Figure S2**). This fact precludes us from performing crystallography experiments. To shed light on the mechanism of Lpm action, we used biochemical and genetic approaches in combination with structural modeling using the available structure of *Thermus thermophilus* RNAP (Vassylyev et al., 2002). We analyzed the effect of Lpm on transcription initiation at the *lac*UV5 promoter and on promoter-independent initiation on short synthetic DNA templates (scaffold). Our experiments

reveal a new mechanism of transcription inhibitor action that differs from any mechanism described before. We show that Lpm blocks promoter melting and likely traps RNAP at one of the closed intermediates on the pathway to the transcriptionally competent open promoter complex. To our knowledge, Lpm is the first example of an antibiotic whose activity strongly depends on both the σ-subunit structure and the β' switch-2 element implicated in positioning of the template DNA strand at the RNAP catalytic-site cleft.

RESULTS

Lpm blocks *de novo* and primed RNA synthesis at the *lac*UV5 promoter

Previously, it has been suggested that Lpm targets formation of the first phosphodiester bond during transcription initiation (Sonenshein and Alexander, 1979). To test this possibility, we analyzed the effect of Lpm addition on the [^{32}P]-UTP– and ATP-initiated synthesis of the dinucleotide pppApU at the T7A1 promoter and the tetranucleotide pppApApUpU at the *lac*UV5 promoter (**Figure 2A**). Indeed, high-resolution gel analysis showed that synthesis of the dinucleotide and the tetranucleotide was inhibited by Lpm. If Lpm functions by blocking the first phosphodiester bond formation, then addition of a dinucleotide RNA primer, which bypasses the first catalytic step, should abrogate the inhibition. To test this assumption, abortive transcription at the *lac*UV5 promoter was initiated by the addition of three NTPs (UTP, ATP, and GTP) either with or without the 100 μM ApA primer complementary to the positions +1 and +2 of the template (**Figure 2B**). Under these conditions, RNAP synthesizes abortive RNA products up to 9 nucleotides (nt) and forms the promoter-proximal elongation complex containing a 16mer RNA (Brodolin et al., 2004). No difference in inhibition of abortive-products synthesis or elongation-complex formation was observed between *de novo* initiation (IC_{50}~9.2+/-2.6 μM) and initiation in the presence of ApA (IC_{50}~12.5+/-3 μM). Thus, we concluded that Lpm does not affect the first catalytic step *per se*. The inhibition concentration (IC_{50}) values obtained for the *lac*UV5 promoter correspond well to the

previously reported IC_{50} for *E. coli* RNAP of 8 μg/ml (Sergio et al., 1975) and the equilibrium dissociation constant value for Lpm-RNAP complex (K_d~12-23 μM (Talpaert et al., 1975)). As previously reported, the inhibition of RNA synthesis by Lpm exhibited an "order-of-addition" effect: it was observed if the drug was added to RNAP only before, not after, the formation of an open promoter complex (**Figure S3A**) (Sarubbi et al., 2004; Sergio et al., 1975; Sonenshein and Alexander, 1979).

Lpm targets the β' switch-2 element of the *E. coli* RNAP

Mutations conferring Lpm resistance in *E. coli* have not been characterized biochemically yet. To explore the mechanism of Lpm action, we focused our study on the β' switch-2 element, in which one of the spontaneous mutations conferring the Lpm^R phenotype to *E.faecalis*, *B.subtilis* (Gualtieri et al., 2009; Gualtieri et al., 2006) and *M.tuberculosis* (Kurabachew et al., 2008) was localized. We proposed that Lpm also targets the *E.coli* RNAP β' switch-2 element function. To test this possibility, we compared the ability of Lpm to inhibit transcription initiated at the *lac*UV5 promoter by wild type *E. coli* RNAP or mutant $RNAP^{R337A}$ with a substitution of the conserved arginine residue in the β' switch-2 element (Belogurov et al., 2009). Single-round transcription was initiated by the addition of 4 nt and heparin (**Figure 3A**). The experiment showed that Lpm effectively inhibited synthesis of full length RNA transcripts by wild type RNAP (IC_{50}~15 μM), whereas transcription initiation by the mutant $RNAP^{R337A}$ was much less sensitive to Lpm (IC_{50}~168 μM). Thus, we conclude that Lpm may hinder the β' switch-2 element function, whereas the substitution R337A decreases the affinity of Lpm to its binding site.

Deletion of residues 513 to 519 in the σ^{70} region 3.2 makes RNAP resistant to Lpm

Analysis of the *Thermus* RNAP holoenzyme structure showed that the σ region 3.2 filling the RNA

exit channel is located close to the Lpm binding determinants (**Figure 3B**). Furthermore, the region 3.2 hairpin loop ($\sigma^{3.2HL}$) contacts the β' switch-2 element and the DNA template strand. Thus, Lpm may affect σ-core RNAP interactions, or σ may affect the Lpm binding site formed by the residues of core RNAP. Indeed, core RNAP-driven transcription was less sensitive to Lpm than holo RNAP-driven transcription (see below and (Sonenshein et al., 1977)). However, no difference in inhibition efficiency was observed if the drug was added to core RNAP before or after the σ^{70} subunit, and no change in affinity of the σ^{70} subunit to core RNAP was observed in the presence of 100 μM of Lpm (**Figure S3B**).

To explore the influence of the σ structure on inhibition, we compared RNA synthesis initiated at the *lac*UV5 promoter by RNAP containing either wild type σ^{70} or σ^{70} with a deletion of the residues 513 to 519 ($\sigma^{\Delta 3.2HL}$) (**Figure 3B**). The RNAP bearing mutant $\sigma^{\Delta 3.2HL}$ is deficient in *de novo* initiation on promoters but is fully active when a dinucleotide primer is used for initiation (Kulbachinskiy and Mustaev, 2006). Transcription initiation at the *lac*UV5 promoter in the presence of an ApA primer and increasing concentrations of Lpm was analyzed. The results of these experiment showed that, when RNAP with the $\sigma^{\Delta 3.2HL}$ was used, the synthesis of run-off and abortive RNAs was resistant to 100 μM of Lpm, whereas the wild type enzyme was completely inhibited by Lpm. We propose that region 3.2, because of its proximity to the Lpm binding determinants, can either contribute to formation of the binding site and, thus, increase its affinity to Lpm or can modulate the function of the β' switch-2 in the positioning of template DNA at the active site. The mutant $\sigma^{\Delta 3.2HL}$ in combination with an RNA primer used for initiation makes transcription resistant to Lpm.

Lpm abolishes *lac*UV5 promoter melting

If Lpm blocks transcription by hindering the β' switch-2 function, then it should affect DNA-protein

interactions in the open promoter complex. To test this assumption, we explored whether Lpm blocks formation of the heparin-resistant open promoter complex, the step preceding the initiation of RNA synthesis (**Figure 4A)**. First, RNAP binding to the fluorescein-labeled *lac*UV5 promoter fragments in the presence of 100 μM Lpm and heparin was analyzed by the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) (**Figure 4B**). The assay allows us to detect a mixed population of stable, heparin-resistant open (RP_o) or intermediate complexes (RP_i) formed on the *lac*UV5 promoter (Straney and Crothers, 1985). The results showed that formation of the heparin-resistant RP_o or RP_i was strongly abolished by Lpm, whereas closed complex (RP_c) formation was not affected. Little inhibition of the RP_o/RP_i formation was observed when Lpm-resistant $RNAP^{R337A}$was used in the experiment (**Figure 4B**). To test further if the open complex formation is the target of Lpm, we tested if RNAP can melt promoter DNA in the presence of the inhibitor. Complexes of wild-type or mutant RNAP and *lac*UV5 promoter labeled at the template DNA strand were probed by $KMnO_4$, which reacts with the thymines at the open (melted) DNA regions (**Figure 4C**). The result of the experiment performed with wild-type enzyme shows that the thymines at positions -11, -9, -8, and +1 of the promoter DNA were not accessible to $KMnO_4$ in the presence of Lpm; therefore, the transcription bubble is closed. Little inhibition of promoter melting was observed for the mutant $RNAP^{R337A}$ (**Figure 4C, lanes 4,5**), or if Lpm was added to RNAP after the RP_o formation (**Figure 4C lane 3,6**). Because Lpm fully abolishes formation of the transcription bubble at the *lac*UV5 promoter, we conclude that Lpm blocks isomerization of the closed intermediate complex (RP_i) to the open complex.

Taking into account that *lac*UV5 is a mutant promoter with non-optimal 18 bp spacing between the -10 and -35 consensus elements we explored if Lpm inhibits melting of other promoters as well. Similar to the *lac*UV5, complete inhibition of promoter melting was observed with two natural promoters: the -10/-35 consensus λP_R promoter and the "extended -10" consensus *gal*P2 promoter (**Figure S4A,B**) suggesting that mechanism of inhibition is general.

Lpm does not prevent binding of promoter DNA to the RNAP β' and β pincers

Two possible mechanisms of inhibition by Lpm can be inferred from the above experiments: (1) the downstream segment of promoter DNA (positions -5 to +20) cannot enter the RNAP active-site cleft, as was suggested in the case of myxopyronin (Mukhopadhyay et al., 2008), and, therefore, the promoter melting was abolished; (2) the contacts with downstream DNA were formed but the melting was abolished, as was observed in the case of the RNAP-promoter complexes formed at low temperature (Craig et al., 1998; Spassky et al., 1985). To discriminate between the two mechanisms proposed above, we probed DNA-protein interactions between RNAP and *lac*UV5 promoter using DNAse I footprinting (**Figure 4D,E**). The experiment revealed no significant change in the upstream protection region (non-template positions -45 to -27 and template positions -50 to -28) in the presence of Lpm. Therefore, the RNAP α subunit C-Terminal Domain (CTD) and the σ^{70} subunit region 4.2 remain bound to the promoter DNA in presence of the drug. Also, DNAse I hypersensitive sites (non-template positions -24 and -23 and template positions -25, -35 and -36) reflecting bending of DNA in the open complex remained unchanged. The most dramatic changes were observed downstream the -35 element, at the promoter DNA segment that enters into the active site cleft and the channel formed by the β',β pincers. Quantification of the template DNA strand bands intensity showed only 20-40% of protection from DNAse I in presence of Lpm at the positions -14 and -10 (contacted by the σ^{70} region 3) and positions -3 and +15 (contacted by the β',β pincers) (**Figure 4F**). However ~50-60% of protection of the DNA bases at positions +1 and +8 persist in presence of Lpm. This result suggest that interactions between RNAP and downstream DNA were destabilized but not inhibited completely. Consistent with this conclusion, no effect of Lpm on the downstream DNAse I protection border was observed for the strong λP_R promoter (**Figure S4C**), while promoter melting was fully blocked (**Figure S4A**). Also, some enhancement

in the accessibility of DNAse I was observed in the region between positions -20 to +10 of the λP_R. Stronger inhibition by Lpm of the *lac*UV5 downstream DNAse I protection compared to that of λP_R likely reflects a difference in the structure and stability of the kinetically significant intermediates formed on these two promoters (Saecker et al., 2002).

To provide additional proof that RNAP remains bound to promoter DNA in the presence of Lpm, we performed Exonuclease III (ExoIII) digestion of promoter complexes (**Figure S5**). The results of the experiment showed that the upstream and downstream borders of protection (ExoIII stops around the position -45 and the position +18) remained unchanged. A slight variation in downstream protection likely reflects destabilization of the downstream DNA binding and correlated with the DNAse I footprinting results. Finally, the results of the EMSA and footprinting experiments suggest that Lpm does not affect interaction with the upstream part of the *lac*UV5 promoter (including the -35 element) but destabilizes binding of downstream DNA to the RNAP clamp as reflected by higher accessibility to endonucleolytic digestion by DNAse I in the presence of Lpm. On the basis of the above results, we propose that promoter melting is blocked by Lpm because of the inability of RNAP to bind the single-stranded DNA template (ssDNA) at the RNAP active-site cleft.

Lpm inhibits σ^{70}-dependent RNA synthesis initiated at minimal DNA templates

Lpm can function either by occluding the downstream DNA from binding to the channel formed by the RNAP pincers or simply by preventing the ssDNA fitting (entry) at the active-site cleft. To explore further the mechanism of inhibition, we used a promoter-less synthetic DNA scaffold (**Figure 5A**) comprising a 10 nt single-stranded tail and a 9 nt DNA duplex, analogous to the one used for crystallization (Campbell et al., 2001; Vassylyev et al., 2007). The scaffold mimics the downstream segment of promoter DNA (template DNA positions -8 to +11; non-template DNA positions +3 to +11) that enters the RNAP channel formed by the β and β' pincers in the open

promoter complex. Promoter-independent transcription initiation at the scaffold is strongly stimulated by the σ^{70} subunit (**Figure 5B**) in the same manner as the stimulation observed with the M13 origin DNA (Zenkin and Severinov, 2004). The 13mer RNA was the major product synthesized during initiation on the scaffold in the presence of all NTPs and the CpGpC RNA primer (pRNA3). This finding suggests that transcription starts from the one preferable site. Lpm efficiently inhibited *de novo* RNA synthesis and pRNA3 extension on the assembled scaffold or ssDNA (**Figure 5B and Figure S5**). Furthermore, stronger inhibition was observed on ssDNA (IC_{50} ~ 16 μM) than on the scaffold (IC_{50} ~ 35 μM). This result indicates that interactions between the downstream DNA duplex and RNAP antagonized the inhibition.

We also observe that transcription initiated by core RNAP at the scaffold or ssDNA is less sensitive to Lpm than transcription initiated by the holoenzyme (compare core RNAP IC_{50} ~70 μM and holo RNAP IC_{50} ~ 34 μM) (**Figure 5B, D**). This finding supports the idea that the σ^{70} subunit contributes to the formation of the Lpm binding site. Primed RNA synthesis on ssDNA showed a similar sensitivity to Lpm as the sensitivity observed for *lac*UV5 promoter-dependent transcription (see **Figure 2**). Thus, the inhibition on the scaffold and on the promoter likely involves the same mechanism. To prove that inhibition of RNA synthesis at the scaffold also occurs by targeting the β' switch-2, we performed a pRNA3 primer extension assay by mutant holo and core $RNAP^{R337A}$ at increasing Lpm concentrations (**Figure 5C, D**). The synthesis of RNA was not affected by Lpm in the case of the mutant RNAP. This result indicates that Lpm inhibited transcription on the scaffold through the same mechanism as it did on promoter DNA, likely by targeting switch-2-mediated loading of the ssDNA (positions -8 to +1) to the active-site cleft.

Long RNA-DNA hybrid suppresses Lpm activity

According to the structure of the RNAP-scaffold complex, the interactions with the first 6 nt of the RNA-DNA hybrid comprise most of the contacts formed by the RNAP active-site cleft in the

elongation complex (Vassylyev et al., 2007). Indeed, formation of a 7-nt RNA-DNA hybrid leads to significant stabilization of the scaffold-RNAP complex (Korzheva et al., 1998; Sidorenkov et al., 1998). If Lpm impedes template DNA positioning at the RNAP active-site cleft, then stabilization of the template by a long DNA-RNA hybrid should suppress the inhibition. To explore this possibility, we compared the efficiency of inhibition of UTP addition to RNA primers of 2 (pRNA2), 3 (pRNA3), 7 (pRNA7) and 13 (pRNA13) nucleotides in length (**Figure 5E and Figure S5)**. Addition of [^{32}P]-UTP to RNA primers was performed in the presence of 100 μM Lpm (**Figure 5E**) or with increasing concentrations of Lpm (**Figure S5**). The experiments showed that Lpm strongly inhibited nucleotide addition to the pRNA2 and pRNA3, whereas no (or weak) inhibition was observed for pRNA7 and pRNA13. Furthermore, the sensitivity to Lpm was stronger in the case of *de novo* initiation (IC_{50} ~ 6 μM) than in the case of initiation from pRNA2 or pRNA3 (IC_{50} ~ 15 μM and 35 μM correspondingly). Thus, Lpm targets RNAP determinants that are required mainly for *de novo* initiation of RNA synthesis but are dispensable after the transition to the elongation mode when a stable RNA-DNA hybrid is formed. We propose that long RNA primers confer resistance to Lpm on the scaffold due to stabilization of ssDNA in the active site.

Lpm disturbs contact between RNAP and ssDNA

The results obtained on the *lac*UV5 promoter and on the scaffold suggest that Lpm affects interactions of RNAP with the downstream part of the promoter (positions -11 to +15). To test if Lpm directly blocks binding of the scaffold to RNAP, EMSA and UV cross-linking experiments were performed in parallel (**Figure 6**). The EMSA experiment showed that formation of the RNAP-scaffold complex was not significantly affected by 100 μM Lpm at conditions in which transcription is inhibited completely (**Figure S5A**). UV cross-linking was used to test the close interactions between scaffold DNA and RNAP at equilibrium conditions in solution. The cross-links formed between the scaffold (or ssDNA) and RNAP were to core RNAP (β' or β subunit) and

the σ^{70} subunit. Control experiments showed that cross-links were specific to the template DNA strand (labeled by fluorescein at the 5' end), and no cross-link to the non-template strand was formed (**Figure 6C**). Lpm abolished core-specific cross-links (but not the σ^{70} cross-link) (**Figure 6B**) but did not prevent RNAP-scaffold complex formation in the EMSA experiment (**Figure 6A**). These results suggest that Lpm blocks formation of the contacts between the template DNA strand and core RNAP or changes the conformation of the DNA binding site without significantly affecting the overall stability of the complex.

DISCUSSION

Lpm blocks promoter melting driven by the RNAP β' clamp modules

There are two principal findings of the current study: (1) the antibiotic Lpm inhibits transcription by blocking formation of a transcriptionally competent open promoter complex, and (2) the inhibition requires the integrity of the σ^{70} region 3.2. Structure analysis has shown that Lpm targets several key regulatory elements of the RNAP (the base of β' Zn-finger, the β' Lid, the β' switch-2 and β switch-3) located in the mobile clamp domain. We suggest that the inhibitory effect of Lpm is mainly due to targeting of the β' switch-2 element and the σ^{70} region 3.2, because the antibiotic inhibits RNA synthesis started at the synthetic DNA scaffold, which is independent from other elements of the clamp (Kent et al., 2009; Naryshkina et al., 2006; Toulokhonov and Landick, 2006). Indeed, it was shown that the β' switch-2 controls fitting (or loading) of template DNA into the active-site cleft. This process is required for melting of the promoter transcription start site during open complex formation (Belogurov et al., 2009; Naji et al., 2008). According to the RNAP structure, σ^{70} region 3.2 contacts both the β' switch-2 and template DNA; therefore, it can also participate in template fitting at the active-site cleft (Murakami et al., 2002b; Toulokhonov and Landick, 2006). Our data suggest that Lpm does not block the entry of downstream DNA duplex at

the channel formed by the RNAP β' and β pincers, but it completely blocks formation of the transcription bubble. Furthermore, using a synthetic DNA scaffold, we show that Lpm impedes the interaction between the RNAP core and the template DNA strand. Thus, we suggest that Lpm abolishes β' switch-2–dependent fitting of template DNA (positions -10 to +1) to the active-site cleft. This fitting is required for open complex formation and initiation of RNA synthesis.

Two models based on different sets of data have been proposed for the mechanism of promoter melting during open complex formation. An early model for open complex formation suggests that RNAP forms contacts with the downstream part of the promoter (between promoter positions -5 and +25) before the formation of the open transcription bubble (promoter positions from -11 to +2) (Buc and McClure, 1985; Craig et al., 1998; Davis et al., 2007; Spassky et al., 1985). According to the new model based on real-time kinetics analysis (Rogozina et al., 2009; Schroeder et al., 2009), promoter melting can occur before the formation of RNAP contacts with the downstream part of the promoter DNA. Thus, melting and downstream DNA binding by the RNAP pincers can be uncoupled. Our data fits to the model in which binding of downstream DNA to the RNAP pincers are not sufficient for promoter melting, and active participation of the core RNAP clamp modules is required. Lpm hinders the function of the clamp and blocks the isomerization of the closed intermediate (RP_i) to the open promoter complex.

Lipiarmycin acts before myxopyronin in the pathway to the open complex

Recently, new antibiotics (myxopyronin, corallopyronin, and ripostatin) targeting the β' switch-2 region have been characterized (Belogurov et al., 2009; Mukhopadhyay et al., 2008). Two models of transcription inhibition for the drugs targeting β' switch-2 have been proposed: one model suggested that the inhibitor precludes loading of the template DNA strand into the RNAP active-site cleft (Belogurov et al., 2009); another suggested that myxopyronin blocks the RNAP clamp in a partially closed conformation that prevents entry of downstream DNA to the channel formed by the

β,β' pincers (Mukhopadhyay et al., 2008). According to the "clamp-closure" model, the inhibitor should not work on ssDNAs. Our results show that Lpm inhibits transcription from an ssDNA more efficiently than from a scaffold DNA with a double-stranded DNA duplex. Hence, Lpm directly targets the ssDNA loading at the RNAP active-site cleft. This finding excludes the myxopyronin-like model of "clamp closure" and favors the "template loading block" model. Furthermore, we propose that Lpm can lock the clamp in an open or partially open conformation (or it can prevent clamp closure) because the downstream part of the promoter DNA becomes partially protected from DNAse I in the presence of the antibiotic. This result may reflect weak binding of DNA at the RNAP active-site cleft and subsequent destabilization of the promoter complex.

Therefore, despite the closely positioned binding sites of Lpm and myxopyronin, there are striking differences in the mechanisms of inhibition. Both molecules act at the promoter melting step; however, the effect of Lpm is much stronger because it completely abolished the transcription bubble formation, whereas myxopyronin only prevented melting of the promoter transcription start site. Therefore, Lpm blocks the transition from closed to open complex, whereas myxopyronin targets the open complex at the final step of promoter melting.

The stronger inhibition of melting induced by Lpm than by myxopyronin is likely due to the concerted targeting several elements of the RNAP clamp and the σ^{70} subunit region 3.2. Indeed, blocking only the β' switch-2 function prevents melting of the start site but not the upstream part of the transcription bubble (Belogurov et al., 2009). Among the elements targeted by Lpm, only the β' Lid was shown to be required for stable open promoter complex formation (Toulokhonov and Landick, 2006). However, deletion of the β' Lid has no effect on promoter melting (Naryshkina et al., 2006). Deletion of the β ' Zn-finger has no effect on promoter complex stability (King et al., 2004), whereas the β switch-3 is implicated in the maintenance of the RNA-DNA hybrid in elongation complexes (Kent et al., 2009). Future studies should explore the effect of Lpm^R substitutions in the Lid, switch-3 and Zn-finger on the promoter melting and transcription initiation.

Template strand fitting links open complex formation and *de novo* initiation of RNA synthesis

We have shown that Lpm can efficiently inhibit $\sigma^{3.2HL}$-stimulated (Brodolin K., unpublished) transcription initiation on the synthetic scaffold templates and ssDNA in a β' switch-2-dependent manner. Thus, template fitting is not only required for promoter melting but also for efficient binding of NTPs at the active site. Indeed, it was shown that three elements targeted by Lpm: β' switch-2 (Naji et al., 2008), σ^{70} region 3.2 (Kulbachinskiy and Mustaev, 2006; Zenkin and Severinov, 2004) and the β' Lid (Naryshkina et al., 2006; Toulokhonov and Landick, 2006), are required for *de novo* initiation of RNA synthesis. Because these elements do not make direct contact with the RNAP NTP-binding site while they interact with the template DNA, we suggest that the stabilization of the template stimulates the initiation of the first phosphodiester bond synthesis or NTP binding. These regions become dispensable as soon as a sufficiently long RNA is synthesized on a promoter or long RNA primers are used for initiation of transcription on promoters or promoter-less templates (Naryshkina et al., 2006; Zenkin and Severinov, 2004). Such RNA primers likely contribute to the stabilization of the template at the active site leading to promoter melting. Indeed, as was shown in the case of mutant ($\beta^{\Delta 186\text{-}433}$) RNAP, lacking one of the pincers (β lobe1), the melting of the *lac*UV5 promoter transcription start site can be detected during the synthesis of long (>6 nt), but not short (<4 nt), RNAs (Brodolin et al., 2005).

Taken together, these results suggest that formation of the open promoter complex and *de novo* initiation of RNA synthesis are tightly linked events subjected to regulation through the template DNA and the β' switch-2. The best known examples are the ribosomal RNA promoters for which stable open complex formation is stimulated by the first initiating nucleotides (Gourse, 1988; Gaal et al., 1997; Ohlsen and Gralla, 1992). Indeed, it was demonstrated that the β' switch-2 element is implicated in regulation of transcription of ribosomal promoters by DksA/ppGpp

(Rutherford et al., 2009).

Lpm senses the structure of the σ factor region 3.2

We have shown that transcription inhibition by Lpm depends on the $\sigma^{3.2HL}$, which is implicated in the stabilization of incoming NTP at the active site. Two possible mechanisms can be deduced from this finding: (1) $\sigma^{3.2HL}$ contributes to the formation of the Lpm binding site by interacting with the RNAP clamp domain; (2) $\sigma^{3.2HL}$ regulates the β' switch-2 function targeted by Lpm. Indeed transcription initiation on scaffold DNA showed that core RNAP is less sensitive to Lpm (and less active in transcription) than holoenzyme. Hence, σ^{70} modulates Lpm activity but it is not mandatory for Lpm binding.

It is tempting to speculate that Lpm abolishes function of the $\sigma^{3.2HL}$ by preventing the subunit's communication with the β' switch-2 element or its interaction with the template DNA. Indeed, if Lpm targets the $\sigma^{3.2HL}$, then transcription that starts from a dinucleotide or a longer RNA primer (when $\sigma^{3.2HL}$ is dispensable) should be resistant to Lpm. We observed such a resistance for transcription initiation at the *lac*UV5 promoter carried by RNAP with the mutant $\sigma^{\Delta 3.2HL}$. This finding suggests that the $\sigma^{3.2HL}$ either affects the conformation of the Lpm binding site or stabilizes the active conformation of the β' switch-2 or both. Interestingly, a similar effect of the deletion in the $\sigma^{3.2HL}$ (residues 507-519, overlapping with the deletion studied in our work) on sensitivity of transcription to rifamycins was previously reported, and it was suggested that $\sigma^{3.2HL}$ acts allosterically through the template DNA strand (Artsimovitch et al., 2005). Thus, the drugs targeting different non-overlapping binding sites may inhibit transcription through a similar mechanism. Meanwhile, an alternative "steric-occlusion" model of rifampicin action was also proposed (Feklistov et al., 2008). Because the binding site of Lpm is close to the σ subunit region 3.2 that is highly variable between the alternative σ factors, we propose that Lpm inhibition activity

should vary between RNAPs bearing alternative σ factors. In support of this proposal, it was shown that transcription of the phage SPO1 later genes driven by the *B. subtilis* RNAP and the phage σ-like factors is resistant to Lpm (Osburne and Sonenshein, 1980). These findings open the way to design σ-specific drugs targeting specific transcription pathways (e.g. activation of virulence genes). Finally, Lpm is the first example of a transcription inhibitor blocking the early step of open promoter complex formation and provides an excellent tool to study this complex process. Clarifying the mechanism of inhibition by Lpm is an essential step in future drug design and awaits new models suitable for crystallographic studies.

MATERIALS AND METHODS

Proteins, DNA templates and RNA

E. coli RNAP core enzyme was purchased from Epicentre. Mutant *E .coli* core RNAP bearing substitution R337A was a generous gift from Dr. Irina Artsimovitch. The wild type σ^{70} subunit cloned in the pET21 vector was expressed in BL21(DE3) strain and purified by affinity chromatography according to Qiagen protocols. The σ^{70} bearing deletion of amino acids 513 to 519 was purified as described in (Kulbachinskiy and Mustaev, 2006). The 116 bp *lac*UV5 promoter fragments (promoter positions from -59 to +58) were produced by PCR with the primers 5'-CTCACTCATTAGGCACCCCAGGC-3' and 5'-CCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGC-3' (Sigma). To label DNA either at the template or non-template strand, fluorescein was introduced at the 5'-end of the primer. DNA scaffolds were assembled from two oligonucleotides: 5'-ACAATGCA-3' and 5'-TGCAATTGTCAGCGATCTA-3' or 5'-TGCAATTGTCATCCGCTCA-3' in the transcription buffer (TB) containing 40mM HEPES pH 8.0, 50mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, and 5% glycerol. Oligonucleotides were heated at 65°C for 5 min. and then annealed by lowering the temperature to 16°C for 30 min. The RNA primers pRNA2 (5'- CG -3'), pRNA3 (5'- CGC -3'), pRNA7 (5'-GAGCGGA-3') and pRNA13 (5'- CGCUAGAUGUUAA -3') were purchased from

Eurogentec.

Transcription at the *lac*UV5 and scaffold DNA

Transcription at the *lac*UV5 promoter was performed in 10µL TB. RNAP holoenzyme was reconstituted by the mixing of σ^{70} subunit (0.5µM final) and 80nM core RNAP and then incubating for 5 min. at 24°C. Next, 1/10 reaction volume of Lpm solution in 50% methanol was added and incubated with RNAP at 37°C for 10 min. The mixture was incubated with *lac*UV5 DNA fragment (13nM) at 37°C for 5 min. to form an open complex. Transcription initiated by addition of ATP, GTP, and CTP (50µM each) and 3µCi [α-^{32}P] UTP was performed for 5 min. at 37°C in presence of 0.1 mg/ml heparin. Transcription at the scaffolds was performed as follows: 80nM RNAP, 200nM scaffold and 1µM RNA primer were incubated at 16°C for 5 min., then at 24°C for 5 min. and supplemented with either [α-^{32}P] UTP or four nucleotides as above. Transcription was carried out for 5 min. at 24°C. The reactions were stopped by adding 90% formamide. RNA was analyzed on 24% PAGE-7M urea denaturing gel.

DNA-protein cross-linking and EMSA

UV cross-linking of the scaffold-RNAP complexes was performed by 2-min. irradiation of the complexes in open Eppendorf tubes placed under the UV-lamp (BLX-E254) at 254nm. Afterwards, cross-linked complexes were resolved by 6% SDS-PAGE. For EMSA experiments, the RNAP-*lac*UV5 promoter complexes, formed as described above, were incubated with 100 µg/ml of heparin for 2 min. at 37°C and loaded on a 5% native 0.5x TBE- PAGE. RNAP-scaffold complexes assembled at 16°C were incubated at room temperature for 5 min. and loaded on 6% native 0.5x TBE- PAGE.

$KMnO_4$ probing and DNAse I footprinting

For $KMnO_4$ probing, reactions were performed in 10µL TB. RNAP (400nM) was incubated with 100µM of Lpm for 10 min. at 37°C. Fluorescein-labeled *lac*UV5 promoter (75nM final) was added to the reaction, which was incubated for another 10 min. at 37°C. The samples were treated with 5mM $KMnO_4$ for 30 sec. at 37°C. The reaction was stopped with the addition of a ½ volume of 1.5M potassium acetate and 1M β-mercaptoethanol. DNA was precipitated by ethanol and incubated with 100µL 0.5M piperidine at 90°C for 15 min. Then DNA was precipitated with n-butanol and washed with 70% ethanol. Dried samples were dissolved in 90% formamide and analyzed on 10% sequencing gel. For DNAseI footprining experiments, *lac*UV5 promoter complexes were formed as described for permangante probing. The samples were treated with 5U/ml DNAse I (Promega) for 1 min. The reactions were stopped by addition of 5mM EDTA pH 8 and 200ng poly(dA-dT). Samples were ethanol precipitated, dried and dissolved in 90% formamide. DNA fragments were analyzed on 10% sequencing gel. Gels were scanned with Typhoon 9400 Imager (GE Healthcare) and quantified using ImageQuant software (Molecular Dynamics). Peak quantification and data processing were done as described in (Sclavi et al., 2005).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Irina Artsimovitch for providing R337A RNAP, Dr. Andrey Kulbachinskiy for the σ^{70} region 3.2 mutant and critical reading of the manuscript, Dr. Bianca Sclavi and Dr. Daria Mamaeva for critical reading and discussion of the manuscript. K.B was supported by RTRS Infectiopole Sud and INSERM. A.T. was supported by the CNRS and the region Languedoc-Roussillon.

Conflict of interests

The authors declare that they have no competing financial interests

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Modeling of the mutations conferring resistance to Lpm in the structure of the *T.*

thermophilus RNAP

A. Chemical structure of Lpm. **B.** Structure of the core RNAP in complex with scaffold DNA (Vassylyev et al., 2007) with the amino acids substitutions conferring resistance to Lpm shown as CPK. Numbering corresponds to *T.thermophilus* and *E.coli* (in brackets) enzymes. The β' switch-2 (magenta), β switch-3 (cyan), β' Lid (orange), β' Zn-finger (brown), and β clamp (purple) elements of the clamp are shown as ribbons. DNA is shown in red (template strand) and dark blue (non-template strand), and RNA is indicated in yellow. Position of the active site is marked by magnesium ion (red sphere). RNAP subunits: β' – khaki, β – blue , α – gold, ω – grey. Molecular graphics images were produced using the UCSF Chimera package (Pettersen et al., 2004).

Figure 2. Lpm inhibits abortive RNA synthesis at the T7A1 and *lac*UV5 promoters

A. Inhibition of dinucleotide (AU) and tetranucleotide (AAUU) synthesis by 100 μM of Lpm. Transcription was initiated at the T7A1 and *lac*UV5 promoters. The [^{32}P]-RNA products separated in a 30% PAGE -7MUrea gel are shown. **B.** Effect of ApA primer on the inhibition by Lpm. Transcription initiated at the *lac*UV5 promoter in the presence of U,G, and A or U,G,A and ApA in the presence of increasing concentrations of Lpm. The [^{32}P]-RNA products separated in a 24% PAGE -7MUrea gel are shown.

Figure 3. Influence of the mutation in the β' switch-2 element and the σ^{70} region 3.2HL deletion on the inhibition of transcription at the *lac*UV5 promoter

A. Inhibition of transcription initiated at the *lac*UV5 promoter by wild type RNAP (**WT**) and mutant RNAP^{R337A} (**R337A**) in the presence of increasing concentrations of Lpm. The run-off [^{32}P]-RNA products separated in a 24% PAGE -7MUrea gel and quantification of the experiment are shown. The quantity of run-off RNA synthesized by wild type (black circles) or mutant (open circles) RNAPs is plotted as a function of inhibitor concentration. **B.** Modeling of the σ^{A} subunit

region 3.2 from the *T. thermophilus* holoenzyme (Vassylyev et al., 2002) on the structure of scaffold-RNAP complex (Vassylyev et al., 2007). The σ subunit is shown as green ribbons with the deletion of amino acids 513 to 519 in the region 3.2 as CPK. The elements of the RNAP clamp domain bearing Lpm^R mutations are shown as ribbons, and the mutated residues as spheres. Color codes are as described in Figure 1B. Dinucleotide RNA primer is shown in yellow. **C.** Inhibition of transcription initiated by RNAP carrying either wild type σ^{70} (**WT**) or mutant $\sigma^{\Delta 3.2HL}$ (**Δ3.2HL**) in the presence of increasing concentrations of Lpm. [^{32}P]-RNA products separated in a 24% PAGE -7MUrea gel are shown. Transcription was performed in the presence of ApA primer. **D.** Quantification of the experiment shown in **panel C**. The quantity of run-off RNA synthesized by wild type (black circles) or mutant (open circles) RNAPs is plotted as the function of the inhibitor concentration. Mean values and s.d. from two independent experiments are presented.

Figure 4. Lpm blocks formation of the *lac*UV5 promoter open complex

A. Kinetic steps in transcription initiation at the lacUV5 promoter (Buc and McClure, 1985). **P** – promoter, **R** – RNAP, $\mathbf{RP_c}$ – closed complex, $\mathbf{RP_i}$ – intermediate complex, $\mathbf{RP_o}$ – open complex.

B. EMSA of the complexes of RNAP (**WT** – wild-type, **R337A -** mutant $RNAP^{R337A}$) and fluorescein-labeled *lac*UV5 promoter fragment formed either in the presence of Lpm or heparin or both. Complexes were resolved in native 5% PAGE. The position of the open complex (RP_o), closed complex (RP_c) and non bound DNA (Free DNA) are shown. **C**. $KMnO_4$ probing of the *lac*UV5 promoter complexes formed by the wild-type RNAP (**WT**) and mutant $RNAP^{R337A}$ (**R337**A) in the presence of 50 μM of Lpm (lanes 2,3,5,6). Star indicates Lpm added after the RP_o formation (lanes 3,6). DNA was labeled by fluorescein at the 5' end of template strand. The positions of thymines reactive to $KMnO_4$ in the open complex are indicated. **M** - A+G sequencing marker. Profiles on the right show the scan of the lanes for RP_o (red) and RP_o+Lpm (green). **D,E.** DNAse I footprinting of the *lac*UV5 promoter complexes in the presence of 100 μM of Lpm. DNA labeled

either at non-template (panel **D**) or template (panel **E**) strands. Profiles on the right show the scan of the lanes for free DNA (blue), RPo (red) and RPo + Lpm (green). **F.** The bar graph shows quantification of the DNAse I footprinting result for template DNA strand. The ratio of peak area values for indicated bands within the promoter region protected by RNAP in RPo in presence or without Lpm were normalized to the peak area values for corresponding bands of free DNA. **[T-45]** and **[T-35]** designate the sum of signals in the positions -45 to -39 and the positions -34 to -30 correspondingly. The peak areas values of the bands within the each lane were normalized to the area values of the bands not protected by RNAP within the same lane (positions -48, -50). An average and standard errors of two experiments is shown. The quantified bands are indicated by the red stars on the panel **D**. The RNAP holoenzyme domains interacting with the DNA bases at the indicated positions of promoter in RPo are shown schematically beneath the bar graph.

Figure 5. Lpm inhibits σ^{70}-dependent RNA synthesis from promoter-less templates

A. The sequences of the minimal DNA scaffold and the annealed 3 nt RNA primer (pRNA3) are shown. Nucleotides are numbered with respect to the site of the first nucleotide addition (+1). **B.** Synthesis of RNA initiated from pRNA3 by core RNAP (lanes 1 to 10) or holoenzyme (lanes 11 to 20) in the presence of increasing concentrations of Lpm. Transcription was initiated from either single-stranded template (ssDNA, lanes 1 to 5; 11 to 15) or assembled scaffold (Scaffold, lanes 6 to 10; 16 to 20). The insert on the right shows the low exposure of the gel for lanes 16 to 20. The lengths of the RNA chains are indicated on the right. **C.** Synthesis of RNA initiated from pRNA3 at the scaffold by the mutant holoenzyme or core $RNAP^{R337A}$ in the presence of increasing concentrations of Lpm. **D.** Quantification of the experiments shown in B and C. The quantity of 9 to 12 nt RNA was plotted as a function of the inhibitor concentration. **E.** The RNA primer length affects the sensitivity of RNA synthesis to Lpm. A scheme of the assembled scaffold and the 7 nt RNA primer (pRNA7) is shown. The panel on the right shows the RNA products produced after the

addition of [^{32}P]-UTP to the RNA primers (pRNA3 and pRNA7) in the presence of Lpm. The length of the synthesized RNA is indicated.

Figure 6. UV cross-linking and EMSA to probe the DNA-protein interactions in the RNAP-scaffold complex in the presence of Lpm

A, B. The UV cross-linked RNAP-scaffold complexes formed without or in the presence of 100 μM of Lpm were resolved by EMSA (A) or SDS-PAGE (B). **C.** UV cross-linking of the oligonucleotides used in scaffold assembly (ssDNA), and assembled scaffold to σ^{70} and holoenzyme. The position of the label either on template (T) or non-template (NT) DNA strands is indicated. Cross-linked complexes resolved on SDS-PAGE are shown.

REFERENCES

Artsimovitch, I., Vassylyeva, M.N, Svetlov, D, Svetlov, V, Perederina, A, Igarashi, N, Matsugaki, N, Wakatsuki, S, Tahirov, T.H and Vassylyev, D.G. (2005). Allosteric modulation of the RNA polymerase catalytic reaction is an essential component of transcription control by rifamycins. *Cell*, **122**, 351-363.

Belogurov, G.A., Vassylyeva, M.N, Sevostyanova, A, Appleman, J.R, Xiang, A.X, Lira, R, Webber, S.E, Klyuyev, S, Nudler, E, Artsimovitch, I and Vassylyev, D.G. (2009). Transcription inactivation through local refolding of the RNA polymerase structure. *Nature*, **457**, 332-335.

Brodolin, K., Zenkin, N and Severinov, K. (2005). Remodeling of the sigma70 subunit non-template DNA strand contacts during the final step of transcription initiation. *J Mol Biol*, **350**, 930-937.

Brodolin, K., Zenkin, N, Mustaev, A, Mamaeva, D and Heumann, H. (2004). The sigma 70 subunit of RNA polymerase induces lacUV5 promoter-proximal pausing of transcription. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 551-557.

Buc, H. and McClure, W.R. (1985). Kinetics of open complex formation between Escherichia coli RNA polymerase and the lac UV5 promoter. Evidence for a sequential mechanism involving three steps. *Biochemistry*, **24**, 2712-2723.

Campbell, E.A., Korzheva, N, Mustaev, A, Murakami, K, Nair, S, Goldfarb, A and Darst, S.A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell*, **104**, 901-912.

Coronelli, C., White, R.J, Lancini, G.C and Parenti, F. (1975). Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes. II. Isolation, chemical, biological and biochemical characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, **28**, 253-259.

Craig, M.L., Tsodikov, O.V, McQuade, K.L, Schlax, P.E.J, Capp, M.W, Saecker, R.M and Record, M.T.J. (1998). DNA footprints of the two kinetically significant intermediates in formation of an RNA polymerase-promoter open complex: evidence that interactions with start site and downstream DNA induce sequential conformational changes in polymerase and DNA. *J Mol Biol*, **283**, 741-756.

Cramer, P., Bushnell, D.A and Kornberg, R.D. (2001). Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, **292**, 1863-1876.

Davis, C.A., Bingman, C.A, Landick, R, Record, M.T.J and Saecker, R.M. (2007). Real-time footprinting of DNA in the first kinetically significant intermediate in open complex formation by Escherichia coli RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 7833-7838.

Feklistov, A., Mekler, V, Jiang, Q, Westblade, L.F, Irschik, H, Jansen, R, Mustaev, A, Darst, S. A., Ebright, R.H. (2008). Rifamycins do not function by allosteric modulation of binding of Mg2+ to the RNA polymerase active center. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **105,** 14820-14825.

Gaal, T., Bartlett, M.S, Ross, W, Turnbough, C.L.J and Gourse, R.L. (1997). Transcription regulation by initiating NTP concentration: rRNA synthesis in bacteria. *Science*, **278**, 2092-2097.

Gourse, R. (1988). Visualization and quantitative analysis of complex formation between E. coli RNA polymerase and an rRNA promoter in vitro. *Nucleic Acids Res.* **16,** 9789-809.

Gross, C.A., Chan, C, Dombroski, A, Gruber, T, Sharp, M, Tupy, J and Young, B. (1998). The functional and regulatory roles of sigma factors in transcription. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **63**, 141-155.

Gualtieri, M., Tupin, A, Brodolin, K and Leonetti, J. (2009). Frequency and characterisation of spontaneous lipiarmycin-resistant Enterococcus faecalis mutants selected in vitro. *Int J Antimicrob Agents*, **34**, 605-606.

Gualtieri, M., Villain-Guillot, P, Latouche, J, Leonetti, J and Bastide, L. (2006). Mutation in the Bacillus subtilis RNA polymerase beta' subunit confers resistance to lipiarmycin. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 401-402.

Helmann, J.D. and deHaseth, P.L. (1999). Protein-nucleic acid interactions during open complex formation investigated by systematic alteration of the protein and DNA binding partners. *Biochemistry*, **38**, 5959-5967.

Kent, T., Kashkina, E, Anikin, M and Temiakov, D. (2009). Maintenance of RNA-DNA hybrid length in bacterial RNA polymerases. *J Biol Chem*, **284**, 13497-13504.

King, R.A., Markov, D, Sen, R, Severinov, K and Weisberg, R.A. (2004). A conserved zinc binding domain in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase modulates intrinsic transcription termination and antitermination but does not stabilize the elongation complex. *J Mol Biol*, **342**, 1143-1154.

Korzheva, N., Mustaev, A, Nudler, E, Nikiforov, V and Goldfarb, A. (1998). Mechanistic model of the elongation complex of Escherichia coli RNA polymerase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **LXIII**, 337-345.

Kulbachinskiy, A. and Mustaev, A. (2006). Region 3.2 of the sigma subunit contributes to the binding of the 3'-initiating nucleotide in the RNA polymerase active center and facilitates promoter clearance during initiation. *J Biol Chem*, **281**, 18273-18276.

Kurabachew, M., Lu, S.H.J, Krastel, P, Schmitt, E.K, Suresh, B.L, Goh, A, Knox, J.E, Ma, N.L,

Jiricek, J, Beer, D, Cynamon, M, Petersen, F, Dartois, V, Keller, T, Dick, T and Sambandamurthy, V.K. (2008). Lipiarmycin targets RNA polymerase and has good activity against multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. *J Antimicrob Chemother*, **62**, 713-719.

Mukhopadhyay, J., Das, K, Ismail, S, Koppstein, D, Jang, M, Hudson, B, Sarafianos, S, Tuske, S, Patel, J, Jansen, R, Irschik, H, Arnold, E and Ebright, R.H. (2008). The RNA polymerase "switch region" is a target for inhibitors. *Cell*, **135**, 295-307.

Murakami, K.S., Masuda, S and Darst, S.A. (2002a). Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 A resolution. *Science*, **296**, 1280-1284.

Murakami, K.S., Masuda, S, Campbell, E.A, Muzzin, O and Darst, S.A. (2002b). Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science*, **296**, 1285-1290.

Naji, S., Bertero, M.G, Spitalny, P, Cramer, P and Thomm, M. (2008). Structure-function analysis of the RNA polymerase cleft loops elucidates initial transcription, DNA unwinding and RNA displacement. *Nucleic Acids Res*, **36**, 676-687.

Naryshkina, T., Kuznedelov, K and Severinov, K. (2006). The role of the largest RNA polymerase subunit lid element in preventing the formation of extended RNA-DNA hybrid. *J Mol Biol*, **361**, 634-643.

Ohlsen, K.L. and Gralla, J.D. (1992). DNA melting within stable closed complexes at the Escherichia coli rrnB P1 promoter. *J Biol Chem*, **267**, 19813-19818.

Osburne, M.S. and Sonenshein, A.L. (1980). Inhibition by lipiarmycin of bacteriophage growth in Bacillus subtilis. *J Virol*, **33**, 945-953.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D, Huang, C.C, Couch, G.S, Greenblatt, D.M, Meng, E.C and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, **25**, 1605-1612.

Rogozina, A., Zaychikov, E, Buckle, M, Heumann, H and Sclavi, B. (2009). DNA melting by RNA polymerase at the T7A1 promoter precedes the rate-limiting step at 37{degrees}C and results in the

accumulation of an off-pathway intermediate. *Nucleic Acids Res*, **37**, 5390-5404.

Rutherford, S.T., Villers, C.L, Lee, J, Ross, W and Gourse, R.L. (2009). Allosteric control of Escherichia coli rRNA promoter complexes by DksA. *Genes Dev*, **23**, 236-248.

Saecker, R.M., Tsodikov, O.V, McQuade, K.L, Schlax P.E. Jr, Capp, M.W, Record, M.T. Jr. (2002) Kinetic studies and structural models of the association of E. coli sigma(70) RNA polymerase with the lambdaP(R) promoter: large scale conformational changes in forming the kinetically significant intermediates. *J Mol Biol.*, **319,** 649-671.

Sarubbi, E., Monti, F, Corti, E, Miele, A and Selva, E. (2004). Mode of action of the microbial metabolite GE23077, a novel potent and selective inhibitor of bacterial RNA polymerase. *Eur J Biochem*, **271**, 3146-3154.

Schroeder, L.A., Gries, T.J, Saecker, R.M, Record, M.T.J, Harris, M.E and DeHaseth, P.L. (2009). Evidence for a tyrosine-adenine stacking interaction and for a short-lived open intermediate subsequent to initial binding of Escherichia coli RNA polymerase to promoter DNA. *J Mol Biol*, **385**, 339-349.

Sclavi, B., Zaychikov, E, Rogozina, A, Walther, F, Buckle, M and Heumann, H. (2005). Real-time characterization of intermediates in the pathway to open complex formation by Escherichia coli RNA polymerase at the T7A1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4706-4711.

Sergio, S., Pirali, G, White, R and Parenti, F. (1975). Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes III. Mechanism of action. *J Antibiot (Tokyo)*, **28**, 543-549.

Sidorenkov, I., Komissarova, N and Kashlev, M. (1998). Crucial role of the RNA:DNA hybrid in the processivity of transcription. *Mol Cell*, **2**, 55-64.

Sonenshein, A.L. and Alexander, H.B. (1979). Initiation of transcription in vitro inhibited by lipiarmycin. *J Mol Biol*, **127**, 55-72.

Sonenshein, A.L., Alexander, H.B, Rothstein, D.M and Fisher, S.H. (1977). Lipiarmycin-resistant ribonucleic acid polymerase mutants of Bacillus subtilis. *J Bacteriol*, **132**, 73-79.

Spassky, A., Kirkegaard, K and Buc, H. (1985). Changes in the DNA structure of the lac UV5 promoter during formation of an open complex with Escherichia coli RNA polymerase. *Biochemistry*, **24**, 2723-2731.

Straney, D.C. and Crothers, D.M. (1985). Intermediates in transcription initiation from the E. coli lac UV5 promoter. *Cell*, **43**, 449-459.

Talpaert, M., Campagnari, F and Clerici, L. (1975). Lipiarmycin: an antibiotic inhibiting nucleic acid polymerases. *Biochem Biophys Res Commun*, **63**, 328-334.

Toulokhonov, I. and Landick, R. (2006). The role of the lid element in transcription by E. coli RNA polymerase. *J Mol Biol*, **361**, 644-658.

Vassylyev, D.G., Sekine, S, Laptenko, O, Lee, J, Vassylyeva, M.N, Borukhov, S and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 A resolution. *Nature*, **417**, 712-719.

Vassylyev, D.G., Vassylyeva, M.N, Perederina, A, Tahirov, T.H and Artsimovitch, I. (2007). Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*, **448**, 157-162.

Villain-Guillot, P., Bastide, L, Gualtieri, M and Leonetti, J. (2007). Progress in targeting bacterial transcription. *Drug Discov Today*, **12**, 200-208.

Zenkin, N. and Severinov, K. (2004). The role of RNA polymerase sigma subunit in promoter-independent initiation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 4396-4400.

Zhang, G., Campbell, E.A, Minakhin, L, Richter, C, Severinov, K and Darst, S.A. (1999). Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 A resolution. *Cell*, **98**, 811-824.

Figure 1

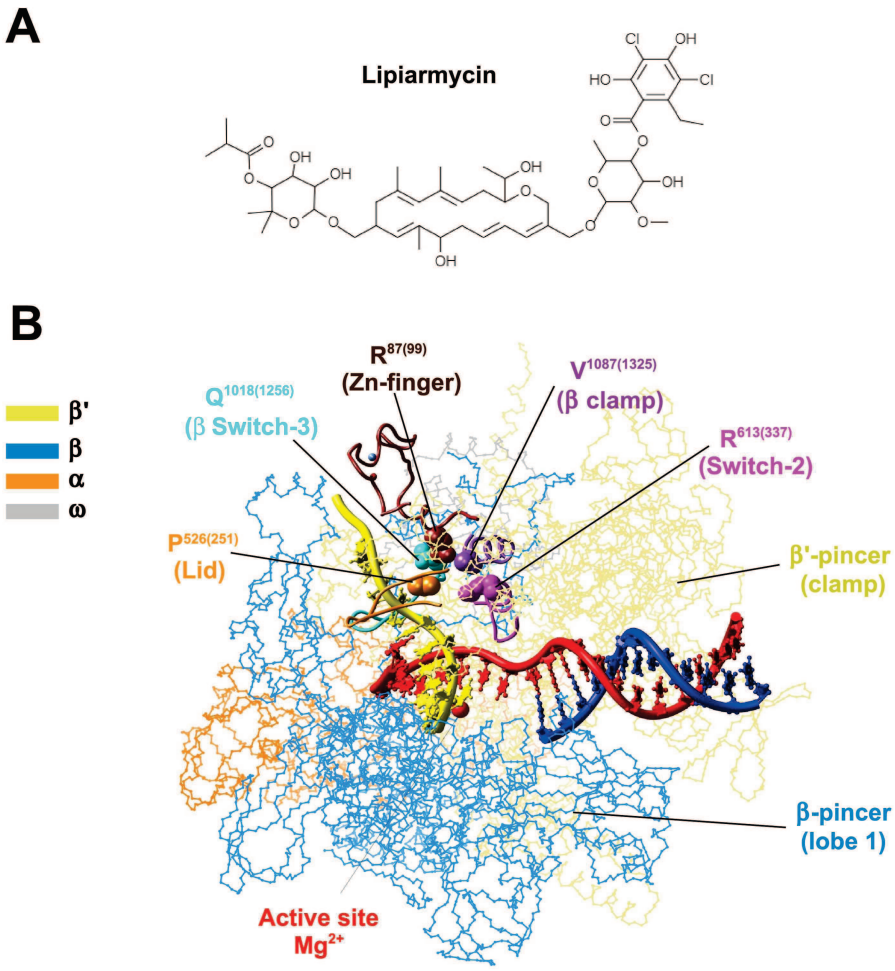


Figure 2

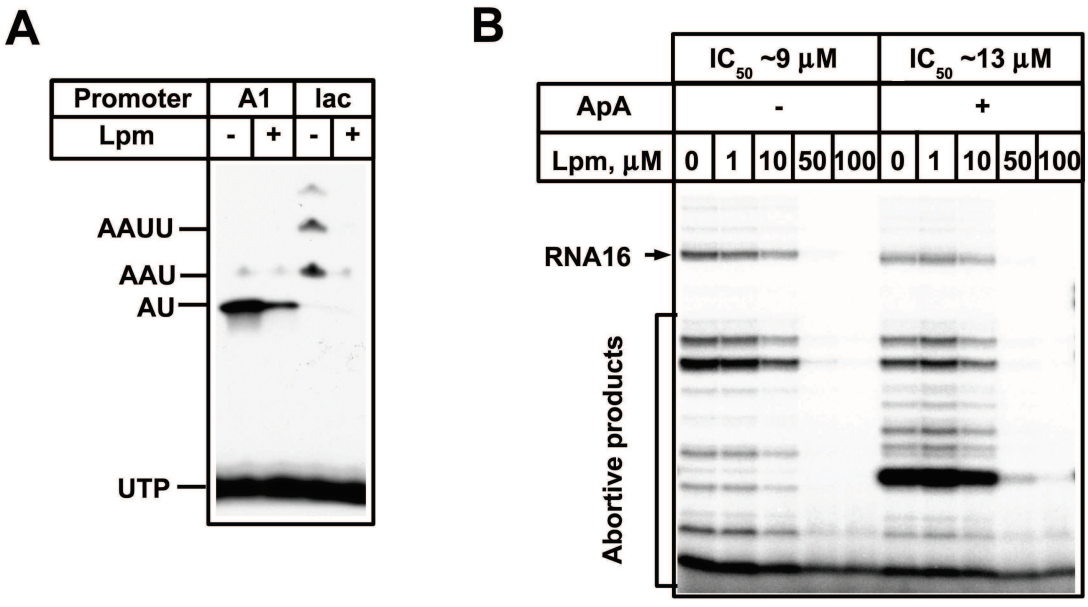


Figure 3

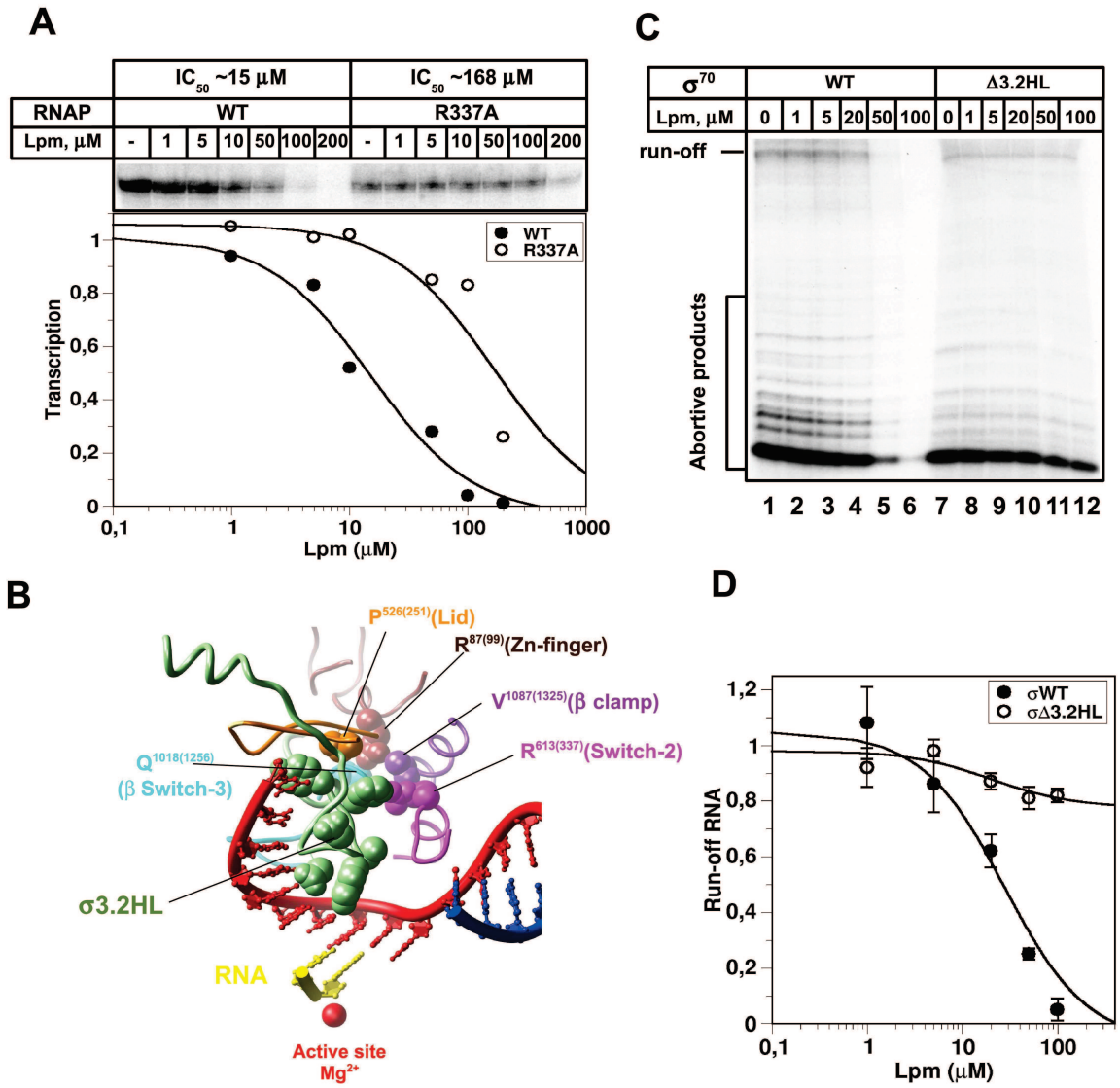

A
IC50 ~15 µM
IC50 ~168 µM
RNAP
WT
R337A
Lpm, µM
- 1 5 10 50 100 200 - 1 5 10 50 100 200
WT
R337A
Transcription
Lpm (µM)
C
σ70
WT
Δ3.2HL
Lpm, µM
0 1 5 20 50 100 0 1 5 20 50 100
run-off
Abortive products
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
B
P526(251)(Lid)
R87(99)(Zn-finger)
V1087(1325)(β clamp)
R613(337)(Switch-2)
Q1018(1256)
(β Switch-3)
σ3.2HL
RNA
Active site
Mg2+
D
σWT
σΔ3.2HL
Run-off RNA
Lpm (µM)

Figure 4

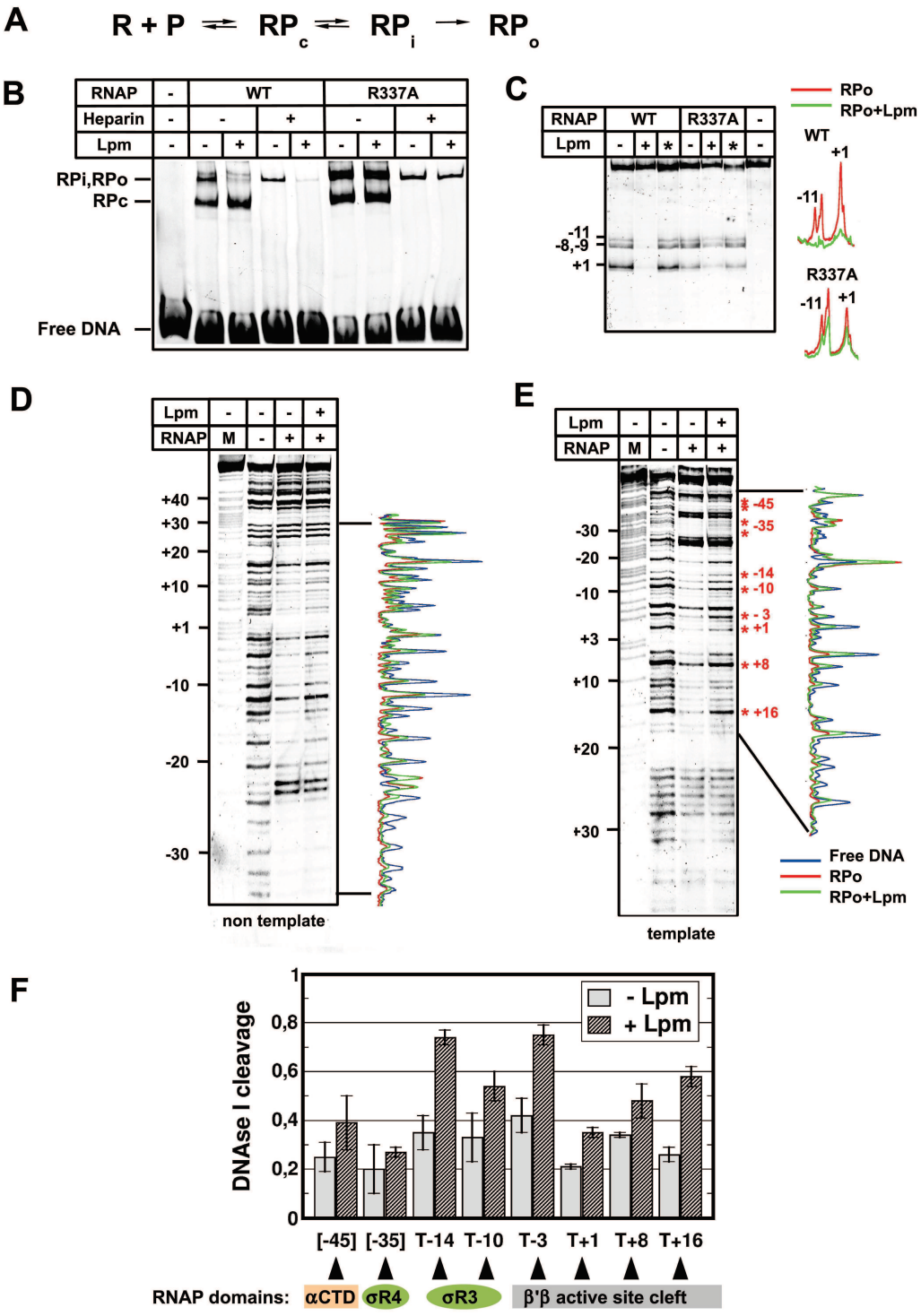

A
R + P ⇌ RP c ⇌ RP i → RP o
B
RNAP
Heparin
Lpm
WT
R337A
RPi,RPo
RPc
Free DNA
C
RNAP
Lpm
WT
R337A
-11
-8,-9
+1
RPo
RPo+Lpm
WT
+1
-11
R337A
-11
+1
D
Lpm
RNAP
M
+40
+30
+20
+10
+1
-10
-20
-30
non template
E
Lpm
RNAP
M
-30
-20
-10
+3
+10
+20
+30
-45
-35
-14
-10
- 3
+1
+8
+16
Free DNA
RPo
RPo+Lpm
template
F
DNAse I cleavage
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
- Lpm
+ Lpm
[-45] [-35] T-14 T-10 T-3 T+1 T+8 T+16
RNAP domains:
αCTD
σR4
σR3
β'β active site cleft

Figure 5

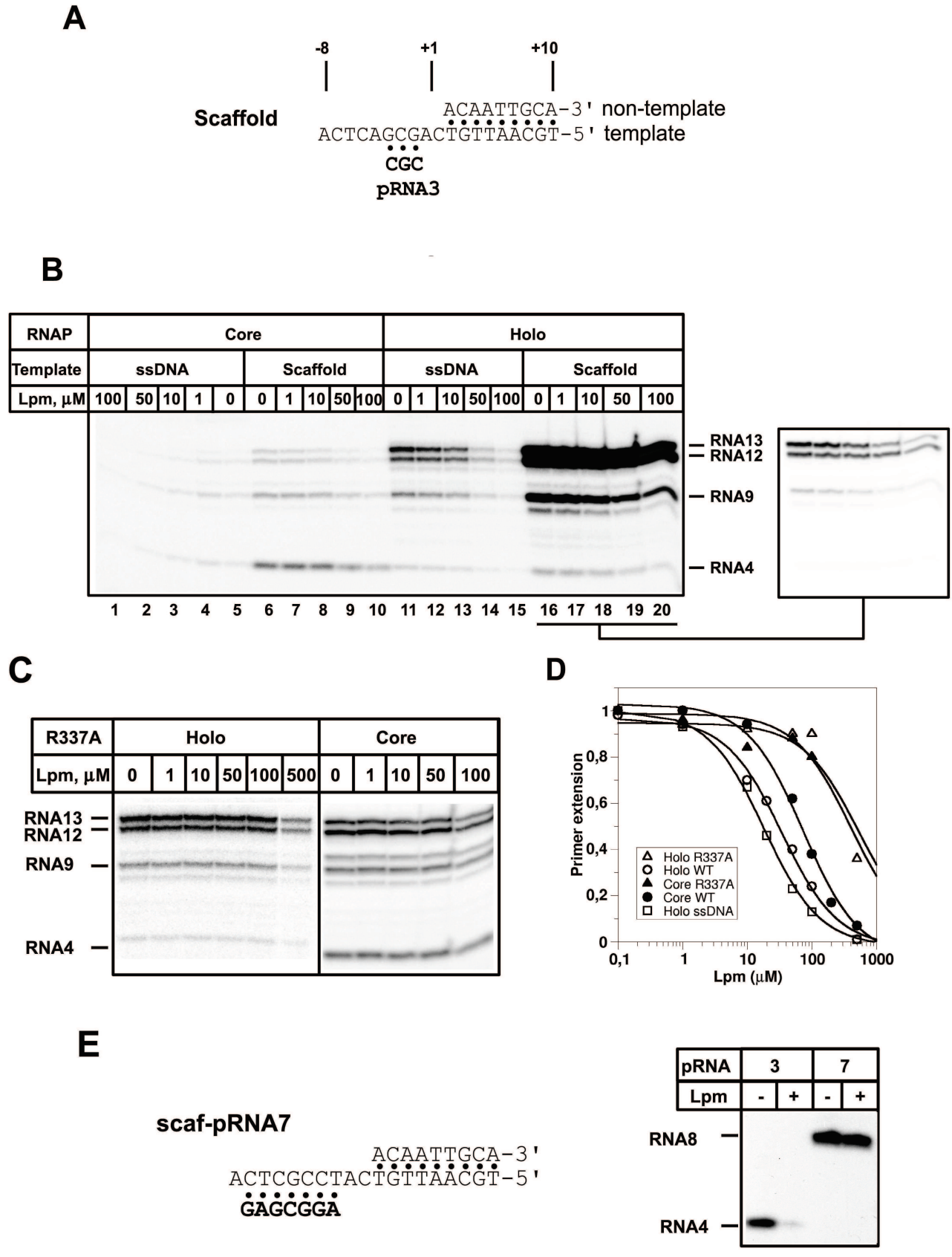
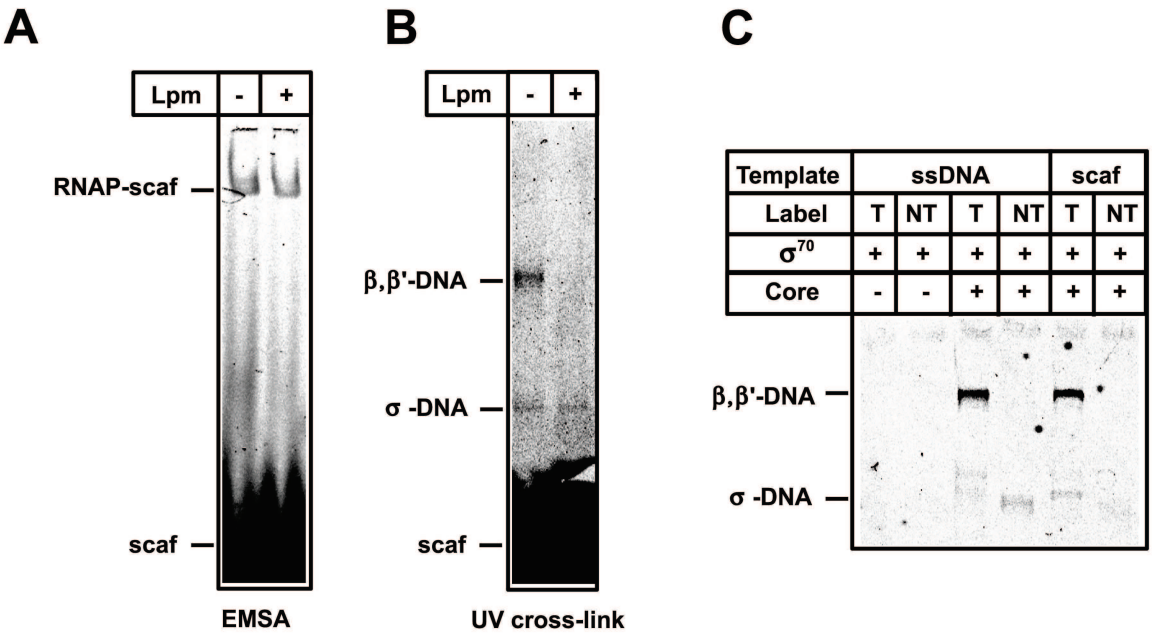

A
-8
+1
+10
Scaffold
ACAATTGCA-3' non-template
ACTCAGCGACTGTTAACGT-5' template
CGC
pRNA3
B
RNAP
Core
Holo
Template
ssDNA
Scaffold
ssDNA
Scaffold
Lpm, µM
100 50 10 1 0 0 1 10 50 100 0 1 10 50 100 0 1 10 50 100
RNA13
RNA12
RNA9
RNA4
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
C
R337A
Holo
Core
Lpm, µM
0 1 10 50 100 500 0 1 10 50 100
RNA13
RNA12
RNA9
RNA4
D
Primer extension
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,1
1
10
100
1000
Lpm (µM)
Holo R337A
Holo WT
Core R337A
Core WT
Holo ssDNA
E
scaf-pRNA7
ACAATTGCA-3'
ACTCGCCTACTGTTAACGT-5'
GAGCGGA
pRNA
3
7
Lpm
- + - +
RNA8
RNA4

Figure 6


A
Lpm
-
+
RNAP-scaf
scaf
EMSA
B
Lpm
-
+
β,β'-DNA
σ -DNA
scaf
UV cross-link
C
Template
ssDNA
scaf
Label
T
NT
T
NT
T
NT
σ70
+
+
+
+
+
+
Core
-
-
+
+
+
+
β,β'-DNA
σ -DNA

Supplementary Data

MATERIALS AND METHODS

Lipiarmycin

Lipiarmycin was prepared from the producer strain *Actinoplanes deccanensis* as described in (Coronelli et al., 1975) and dissolved in methanol to 10mg/ml final concentration.

Proteins and DNA templates

T. aquaticus RNAP holoenzyme was a kind gift from Dr. Andrey Kulbachinskiy. *T. thermophilus* RNAP holoenzyme was kindly provided by Dr. Dmitry Vassylyev. The 153 bp λP_R promoter fragment (promoter positions from -81 to +76) was PCR amplified from phage λ genomic DNA using the primers: 5'-CGTTAAATCTATCACCGCAAGGG-3' and 5'-CTGTCTTGGTTTGCCCAAAGCG-3'. The 195 bp *gal*P2 promoter fragment (promoter positions from -137 to +58) was PCR amplified from *E.coli* genomic DNA using the primers 5' -GCTACCACCGGTAACCAGAA-3' and 5'-AAGCGCAATCATTCATAAACC-3'. Promoter DNA fragments were labeled with fluorescein at the 5' end of the non-template strand. DNA fragments were purified from agarose gel using "PCR Clean-up Gel extraction kit" (MACHEREY-NAGEL).

FIGURE LEGENDS

Figure S1. Positioning of the substitutions conferring resistance to Lpm on the linear maps of the *E.coli* RNAP β' and β subunits. The conserved regions of β' (from A to H) and β (from A to H) are shown by white boxes. The Lpm^R mutations in the β switch-3, β clamp, β' Zn-finger, β' Lid and β' switch-2 (Kurabachew et al., 2008; Gualtieri et al., 2006; Gualtieri et al., 2009) are indicated by the vertical red bars. Location of the clamp domain is indicated by blue line. The alignments of amino acid sequences encompassing the Lpm^R substitutions of *Bacilus subtilis* (B.s.), *Enterococcus faecalis* (E.f.), *Clostridium difficile* (C.d.), *Mycobacterium tuberculosis* (M.t.), *Escherichia coli* (E.c.), *Thermus thermophilus* (T.t.), *Thermus aquaticus* (T.a.) and Human are shown.

Figure S2. Lpm does not inhibit *Thermus* RNAPs. **A.** Transcription initiated at the *lac*UV5 promoter by *T. aquaticus* (T.a) RNAP in presence of increasing concentrations of Lpm. The [^{32}P]-RNA products separated in a 24% PAGE -7MUrea gel are shown. **B.** Transcription initiated at the scaffold by *E. coli* (**E.c**) or *T. thermophilus* (**T.t**) RNAPs in presence of CGC RNA primer, NTPs and the indicated concentrations of Lpm. The [^{32}P]-RNA products separated in a 24% PAGE -7MUrea gel are shown. Transcription was performed for 10 min in TB (40mM HEPES pH 8.0, 50mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, and 5% glycerol) at 45°C.

Figure S3. Lpm exhibits "order-of-addition" effect and does not reduce affinity of σ^{70} to core RNAP. **A.** Inhibition of transcription initiated at the *lac*UV5 promoter in presence of 50μM Lpm. Lpm was added before the formation of RNAP holoenzyme (lane 2), before addition of promoter DNA (lane 3) or after the addition of promoter DNA and formation of the open promoter complex (lane 4). Lane 1 – no Lpm. Order of addition is schematically indicated at the top of the panel. The run-off [^{32}P]-RNA products separated in a 24% PAGE -7MUrea gel are shown. **B,C.** Interactions between σ^{70} and core RNAP in presence of Lpm probed by ELISA as described in (André2004). The σ^{70} subunit (300nM in PBS) was coated on a MaxiSorp™ Surface Immuno 96 MicroWell™ plate (Nunc). 60nM of core RNAP was then added in presence of increasing concentrations of Lpm Binding of core RNAP to the σ^{70} was detected using anti-β' monoclonal antibody stained with horseradish peroxidase conjugate and quantified by measuring the absorption at 490nm (**panel B**). Control experiment (**panel C**) was done following the same protocol, without Lpm and in presence of increasing concentrations of σ^{70} added before the anti-β' monoclonal antibody.

Figure S4. Lpm blocks open complex formation at the λP_R and *gal*P2 promoters. **A,B.** RNAP holoenzyme (250nM final concentration) was incubated with 100μM of Lpm in 10μL TB containing 10mM $MgCl_2$ for 10 min at 37°C. Then, λP_R (**panel A**) or *gal*P2 (**panel B**) promoter DNA (20nM final concentration) was added and incubated for 15min at 37°C. Samples were treated

with 5mM $KMnO_4$ for 30s. The profiles on the right show the scans of the gel lanes for RNAP complexes either without (blue) or with Lpm (red). The non-template thymines reactive with $KMnO_4$ in open complex are numbered. Lane **M** - A+G sequencing marker. **C.** DNAseI footprinting of λP_R complexes in presence of 100μM of Lpm. Complexes were formed as described above. The samples were treated with 5U/mL DNAseI for 1min. The region of DNAseI protection (positions -20 to +10) effected by Lpm is indicated on the left by black line. Lane **M** - A+G sequencing marker.

Figure S5. ExoIII digestion of the *lac*UV5 promoter complexes in presence of Lpm. **A**. Kinetics of ExoIII digestion of the *lac*UV5 promoter complexes labeled at the non-template strand. Complexes of RNAP (250nM final concentration) and fluorescein-labeled *lac*UV5 promoter fragment (20nM final concentration) were formed either without (lanes 2-5) or in the presence of 100μM Lpm (lanes 6-9). The samples were treated with ExoIII (50U/mL) for 5, 7 or 10 minutes at 37°C. Reaction was stopped by addition of 5mM EDTA pH8 and 200 ng poly(dA-dT). Samples were ethanol precipitated, dissolved in 90% formamide and analyzed on 10% sequencing gel. Lane **M**: A+G sequencing marker **B.** ExoIII digestion of the *lac*UV5 promoter complexes labeled at the template strand. Complexes of RNAP and fluorescein-labeled *lac*UV5 promoter fragment were formed either without (lanes 1,2) or in the presence of 100μM Lpm (lanes 3,4). Lane 4 - Lpm was added after *lac*UV5-RNAP complex formation. The samples were treated with ExoIII (50U/mL) for 5min at 37°C. Samples were analyzed as on panel A. Lane **M**: A+G sequencing marker.

Figure S6 Inhibition of *de novo* and primed RNA synthesis on the DNA scaffolds. **A.** Transcription initiated from the DNA scaffold in presence of all NTPs and increasing concentrations of Lpm. The [^{32}P]-RNA products separated in a 24% PAGE -7MUrea gel are shown. **B.** Quantification of the experiment shown on the panel A. **C.** Addition of [^{32}P]-UTP to RNA primers (pRNA2, pRNA3, pRNA7 and pRNA13) by RNAP holoenzyme. Configuration of the scaffolds used for each

experiment is shown on the left. Template DNA strand in red, non-template DNA strand in blue, RNA primer in yellow. **D.** Quantification of the experiments shown on the panel **E**. The amount of incorporated [^{32}P]-UTP is plotted as function of Lpm concentration.

REFERENCES

André, E., Bastide, L, Villain-Guillot, P, Latouche, J, Rouby, J and Leonetti, J. (2004). A multiwell assay to isolate compounds inhibiting the assembly of the prokaryotic RNA polymerase. *Assay Drug Dev Technol*, **2**, 629-635.

Coronelli, C., White, R.J, Lancini, G.C and Parenti, F. (1975). Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes. II. Isolation, chemical, biological and biochemical characterization. *J Antibiot (Tokyo)*, **28**, 253-259.

Gualtieri, M., Tupin, A, Brodolin, K and Leonetti, J. (2009). Frequency and characterisation of spontaneous lipiarmycin-resistant Enterococcus faecalis mutants selected in vitro. *Int J Antimicrob Agents*, **34**, 605-606.

Gualtieri, M., Villain-Guillot, P, Latouche, J, Leonetti, J and Bastide, L. (2006). Mutation in the Bacillus subtilis RNA polymerase beta' subunit confers resistance to lipiarmycin.. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 401-402.

Kurabachew, M., Lu, S.H.J, Krastel, P, Schmitt, E.K, Suresh, B.L, Goh, A, Knox, J.E, Ma, N.L, Jiricek, J, Beer, D, Cynamon, M, Petersen, F, Dartois, V, Keller, T, Dick, T and Sambandamurthy, V.K. (2008). Lipiarmycin targets RNA polymerase and has good activity against multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. *J Antimicrob Chemother*, **62**, 713-719.

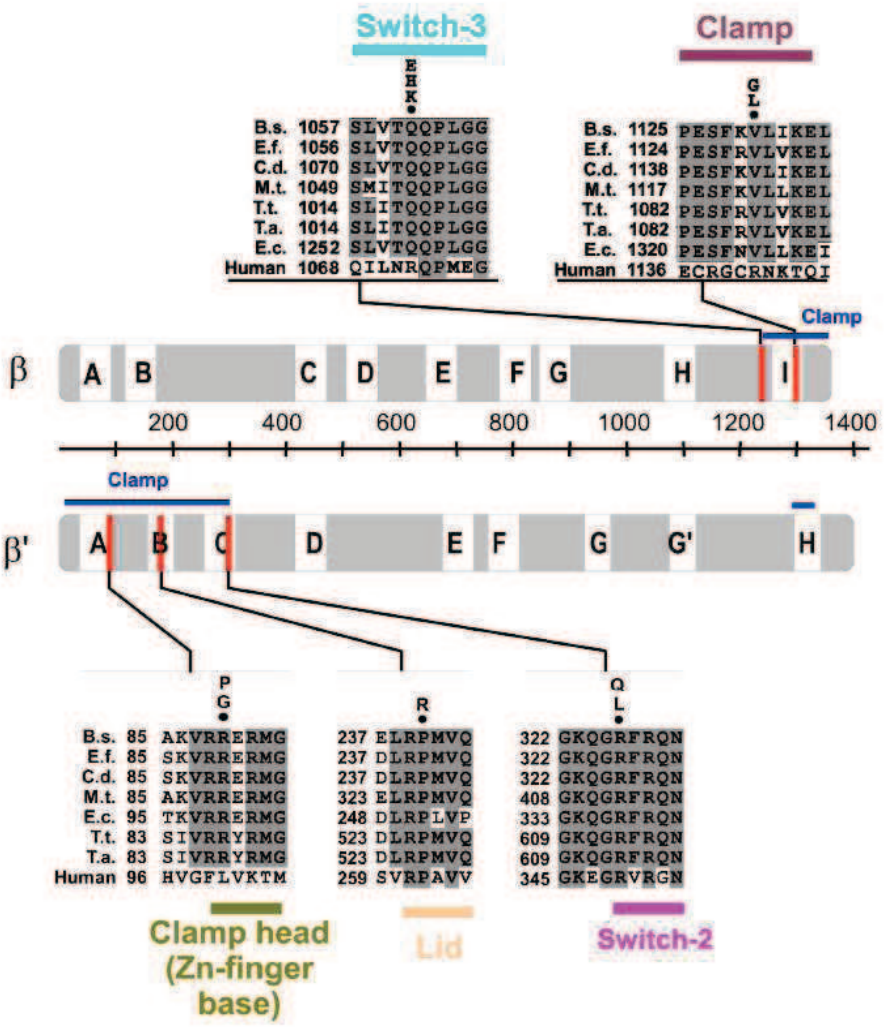

Switch-3
Clamp
E
H
K
G
L
B.s. 1057 SLVTQQPLGG
E.f. 1056 SLVTQQPLGG
C.d. 1070 SLVTQQPLGG
M.t. 1049 SMITQQPLGG
T.t. 1014 SLITQQPLGG
T.a. 1014 SLITQQPLGG
E.c. 1252 SLVTQQPLGG
Human 1068 QILNRQPMEG
B.s. 1125 PESFKVLIKEL
E.f. 1124 PESFRVLVKEL
C.d. 1138 PESFKVLIKEL
M.t. 1117 PESFKVLLKEL
T.t. 1082 PESFRVLVKEL
T.a. 1082 PESFRVLVKEL
E.c. 1320 PESFNVLLKEI
Human 1136 ECRGCRNKTQI
Clamp
β
A B C D E F G H I
200 400 600 800 1000 1200 1400
Clamp
β'
A B C D E F G G' H
P
G
R
Q
L
B.s. 85 AKVRRERMG
E.f. 85 SKVRRERMG
C.d. 85 SKVRRERMG
M.t. 85 AKVRRERMG
E.c. 95 TKVRRERMG
T.t. 83 SIVRRYRMG
T.a. 83 SIVRRYRMG
Human 96 HVGFLVKTM
237 ELRPMVQ
237 DLRPMVQ
237 DLRPMVQ
323 ELRPMVQ
248 DLRPLVP
523 DLRPMVQ
523 DLRPMVQ
259 SVRPAVV
322 GKQGRFRQN
322 GKQGRFRQN
322 GKQGRFRQN
408 GKQGRFRQN
333 GKQGRFRQN
609 GKQGRFRQN
609 GKQGRFRQN
345 GKEGRVRGN
Clamp head (Zn-finger base)
Lid
Switch-2

Figure S1

Figure S2

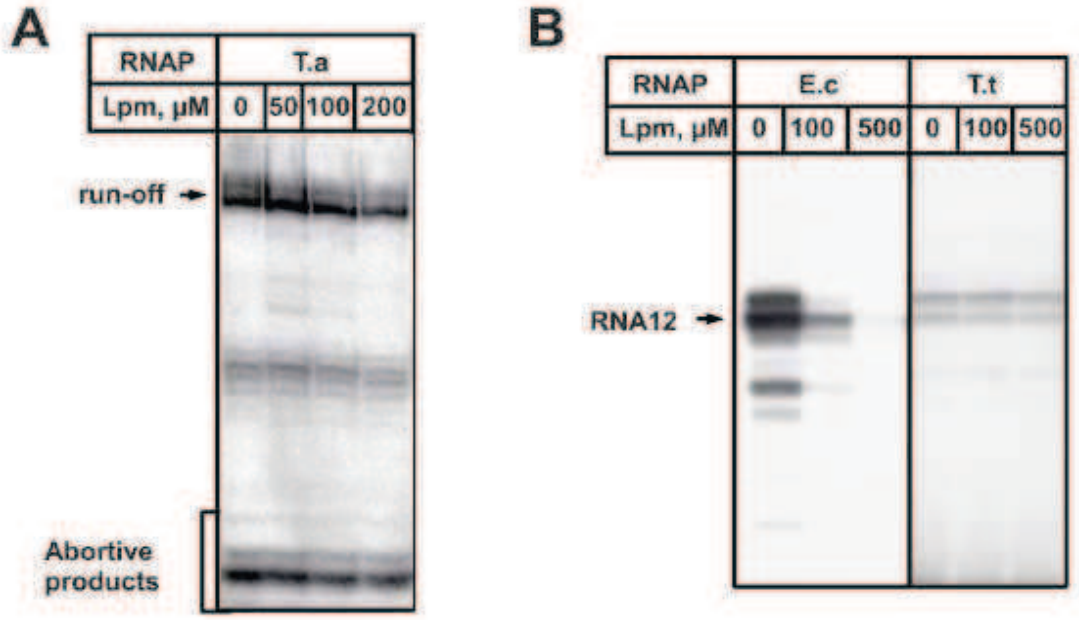
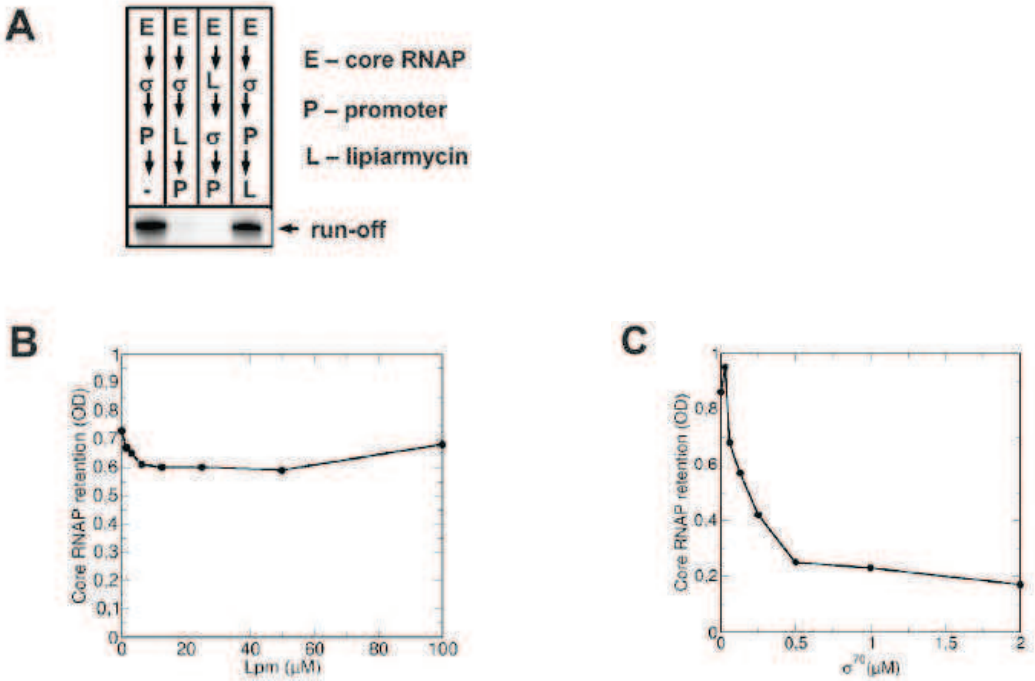


Figure S3



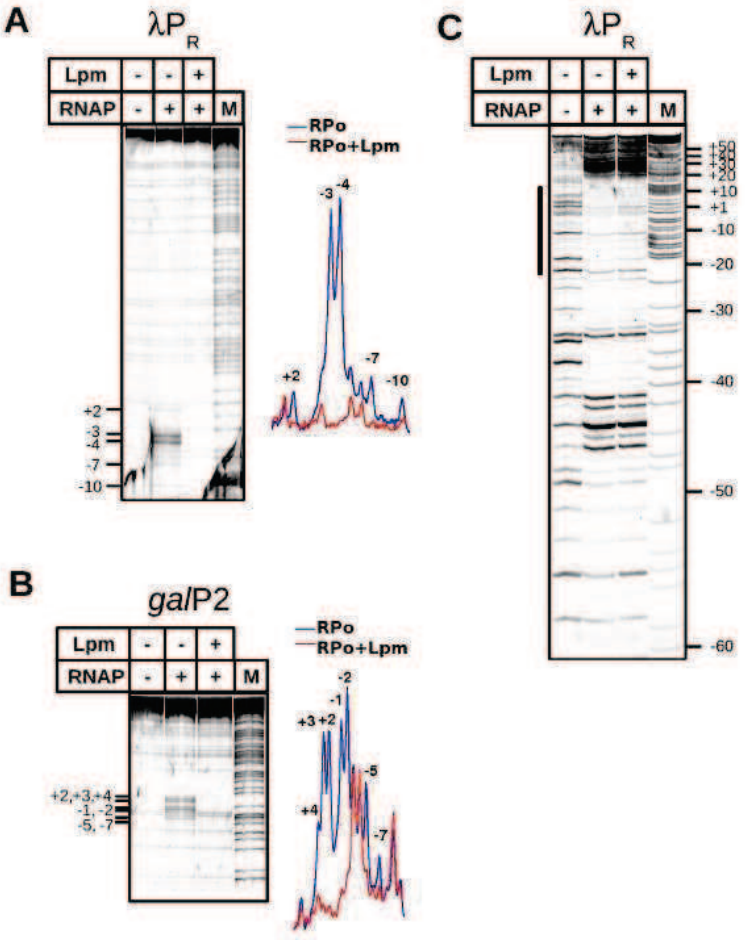

A
λP R
Lpm - - +
RNAP - + + M
RPo
RPo+Lpm
+2
-3
-4
-7
-10
B
galP2
Lpm - - +
RNAP - + + M
RPo
RPo+Lpm
+2,+3,+4
-1, -2
-5, -7
C
λP R
Lpm - - +
RNAP - + + M
+50
+40
+30
+20
+10
+1
-10
-20
-30
-40
-50
-60

Figure S4

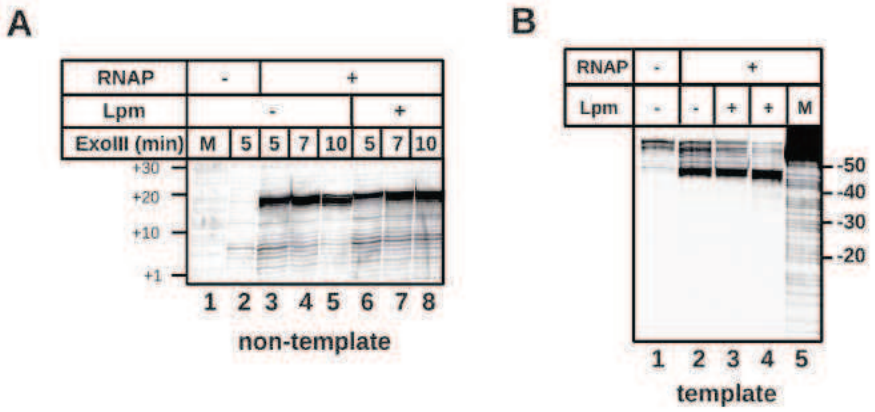

A
RNAP
Lpm
ExoIII (min)
M
5
5
7
10
5
7
10
+30
+20
+10
+1
1 2 3 4 5 6 7 8
non-template
B
RNAP
Lpm
M
-50
-40
-30
-20
1 2 3 4 5
template

Figure S5

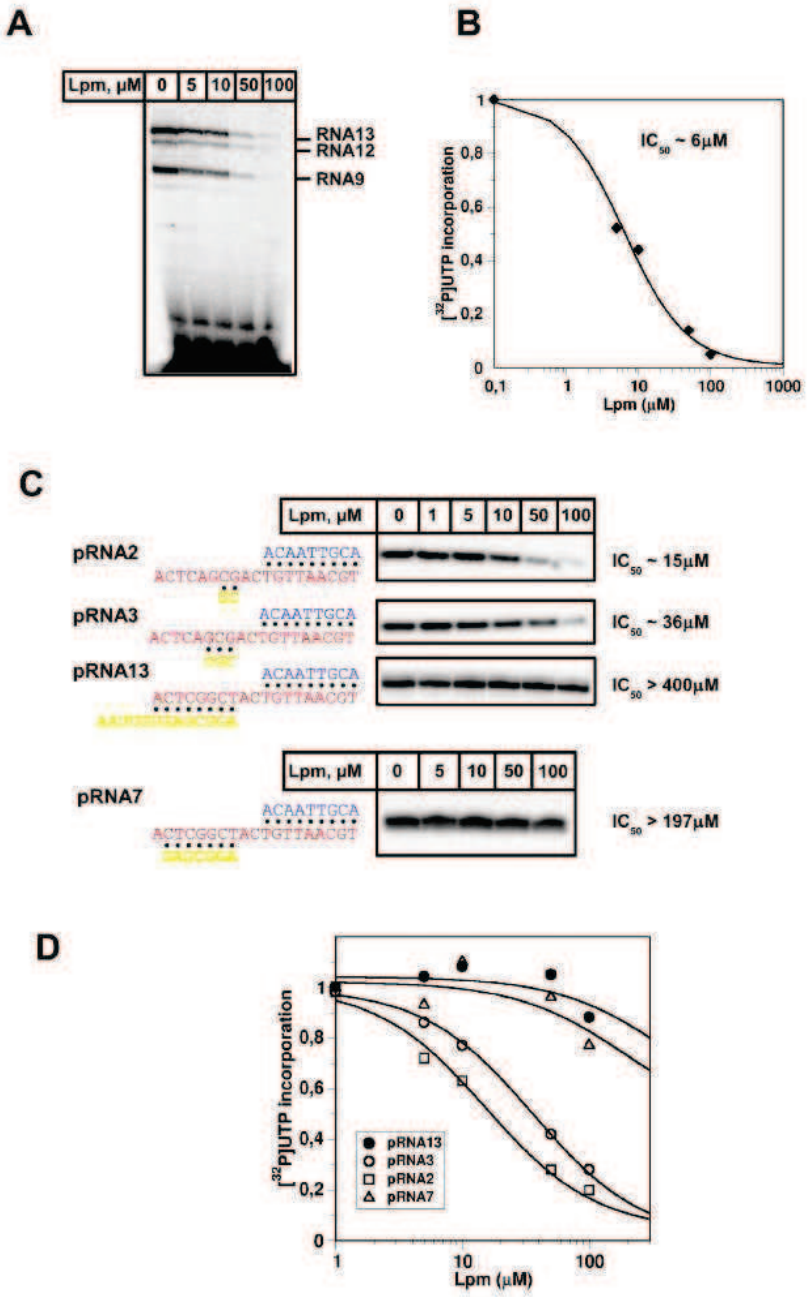

A
Lpm, μM 0 5 10 50 100
RNA13
RNA12
RNA9
B
IC50 ~ 6μM
[32P]UTP incorporation
Lpm (μM)
C
Lpm, μM 0 1 5 10 50 100
pRNA2
ACAATTGCA
ACTCAGCGACTGTTAACGT
IC50 ~ 15μM
pRNA3
IC50 ~ 36μM
pRNA13
IC50 > 400μM
Lpm, μM 0 5 10 50 100
pRNA7
IC50 > 197μM
D
[32P]UTP incorporation
pRNA13
pRNA3
pRNA2
pRNA7
Lpm (μM)

Figure S6

CHAPITRE III – DISCUSSION

L'ARNP est une enzyme essentielle aux bactéries, ciblée par une douzaine d'antibiotiques. La grande majorité, comme la lipiarmycine sont d'origine naturelle. La lipiarmycine a été décrite comme un inhibiteur de la transcription en 1976 mais son mécanisme d'action restait inconnu jusqu'à ce jour. Nous avons démontré que la molécule inhibait la formation du complexe ouvert en affectant la fonction de l'élément « switch-2 » du core de l'enzyme et que cette inhibition requérait l'intégrité de la région 3.2 de σ. D'autres inhibiteurs ont été décrits comme ciblant l'élément « switch-2 », il s'agit de la myxopyronine, de la corallopyronine et de la ripostatine qui partagent un même site de liaison (Mukhopadhyay, Cell, 2008). De façon intéressante, la lipiarmycine et la myxopyronine ont des sites de liaison chevauchants mais ont des mécanismes d'action différents. En effet, deux mécanismes d'action ont été proposés pour la myxopyronine. Un article (Mukhopadhyay, Cell, 2008) propose que la liaison de la molécule à l'élément « switch-2 », la charnière qui connecte le core au reste de l'ARNP et permet son ouverture et sa fermeture, induit un effet allostérique qui bloque le « clamp » dans un état fermé ou partiellement fermé et qui empêche par conséquent l'entrée de la partie avale de l'ADN dans le canal du site actif. Nos résultats indiquent qu'en présence de lipiarmycine l'ADN aval pénètre dans ce canal. Donc, d'après le modèle de Mukhopadhyay *et al.* l'action de la lipiarmycine se situerait après celle de la myxopyronine alors que d'après l'article de Belogurov *et al.* Elle se situerait avant. En effet, le deuxième article (Belogurov, Nature, 2009) propose que la liaison de la myxopyronine stabilise l'élément « switch-2 » dans un état de conformation inhibant la formation des contacts entre l'ARNP et la partie avale de l'ADN. Cette proposition corrèle en partie avec nos résultats sur la lipiarmycine puisque nous avons démontré qu'en présence de lipiarmycine le core n'interagit pas avec la partie avale du brin matrice. Les mutations conférant une résistance à la myxopyronine et définissant son site de liaison au niveau de l'élément « switch-2 » se trouvent sur des résidus β' situés majoritairement en aval du site de liaison de la lipiarmycine (β' R337). La modélisation montre que dans les deux cas certains résidus ne contactent pas directement l'ADN, suggérant un effet allostérique. Les sites de liaison de la lipiarmycine et de la myxopyronine étant chevauchants mais non superposables, nous pouvons donc nous attendre à des variations entre les deux mécanismes d'action. Et en effet, nous avons montré que la lipiarmycine bloquait complètement la formation du complexe ouvert alors que la myxopyronine n'empêche pas la fusion des nucléotides amonts mais bloque la propagation de la bulle de transcription au delà de la position -3. Il pourrait donc y avoir une corrélation entre la position avale de la myxopyronine et son action plus tardive dans la voie de formation du complexe ouvert par rapport à la lipiarmycine. Nous en déduisons que ces deux molécules affectent des intermédiaires conformationnels différents. La lipiarmycine bloquerait la transition entre le complexe fermé et le complexe ouvert alors que la myxopyronine

agirait sur une des dernières étapes de la fusion du promoteur lors de la formation du complexe ouvert. De plus le site de liaison de la lipiarmycine implique d'autres éléments du core que « switch-2 », contrairement à la myxopyronine, et notamment le β' « lid » qui est nécessaire à la formation de complexes ouverts stables (Toulokhonov, J. Mol. Biol., 2006). La lipiarmycine présente donc un nouveau mécanisme d'action. Ces résultats sont intéressants d'un point de vue fondamental car ils permettent une meilleure compréhension de la fonction des différents domaines de l'ARNP bactérienne. Ils sont également intéressants d'un point de vue thérapeutique car ce nouveau mécanisme d'action limite le risque de résistance croisée avec d'autres inhibiteurs. D'ailleurs il n'y a pas de résistance croisée entre la rifampicine et la lipiarmycine. Cette propriété est très intéressante car une étude *in vitro* a montré que la lipiarmycine était active sur des souches cliniques de *M. tuberculosis* multirésistantes. Si cette propriété est confirmée *in vivo*, même si elle est moins active, la lipiarmycine pourrait constituer une thérapie alternative pour traiter la tuberculose.

La grande majorité des inhibiteurs de la transcription testés à ce jour ont un effet sur les biofilms. La molécule la plus intéressante étant CBR avec une diminution du nombre de bactéries de l'ordre de $3\log_{10}$ à une concentration de 4xCMI, puis la rifampicine avec une diminution de l'ordre de $2\log_{10}$, SB2 ($\sim 1{,}8\log_{10}$), la streptolydigine ($\sim 1{,}5\log_{10}$), enfin, la lipiarmycine a une action assez faible sur les biofilms ($\sim 0{,}5\log_{10}$) qui est peut-être dû à sa dépendance au pH (Villain-Guillot, Antimicrob. Agents Chemother., 2007). Cependant, aucune de ces molécules n'est capable d'éradiquer les biofilms même à une concentration égale à 16xCMI. Cela est dû en grande partie à la présence en leur sein de bactéries persistantes. Or, aucune molécule, à l'exception de la série CBR, ne semble avoir d'effet sur les bactéries persistantes (Villain-Guillot, Antimicrob. Agents Chemother., 2007). En effet, la plupart des antibiotiques n'exerce leur action que sur les bactéries en phase exponentielle. La recherche de nouveaux antibiotiques capables d'éliminer ces bactéries est donc un enjeu majeur pour les années à venir. Des études ont montré que, lors de l'entrée en persistance, les bactéries surexprimaient certains gènes codant pour des protéines toxiques pour la cellule à partir d'opérons toxine-antitoxine (TA). Cette expression inhiberait la croissance des bactéries et induirait leur entrée en persistance. L'inhibition de l'expression de ces toxines ou la surexpression de l'antitoxine associée pourrait bloquer la transition de l'état de croissance à l'état de persistance. Or, jusqu'à présent, HipA est la seule toxine dont l'inhibition diminue l'apparition de persisters, et cela seulement sous certaines conditions physiologiques et nutritives (Stewart, Int. J. Med. Microbiol., 2002). Ces résultats suggèrent que les gènes impliqués dans l'établissement de la persistance sont redondants. Les différents profils génétiques réalisés sur les bactéries persistantes ont montré que plusieurs protéines, dont différents modules TA, étaient impliqués dans l'induction

de la persistance. Chez *E. coli,* le nombre de modules TA est supérieur à 10 (Brown, J. Bacteriol., 2003) et chez *M. tuberculosis* ce nombre est supérieur à 60 (Arcus, Trends Microbiol., 2005 ; Pandey, Nucleic Acids Res., 2005). En conséquence, l'inhibition de l'expression ou de la fonction d'une seule de ces protéines serait insuffisante à empêcher l'entrée en persistance à cause du phénomène de compensation de fonction dû aux autres protéines. Il a été proposé que la surexpression de pompes à efflux pouvait également être impliquée dans la tolérance des bactéries persistantes à de nombreux antibiotiques en empêchant ces molécules d'atteindre leur cible (Brooun, Antimicrob. Agents Chemother., 2000). L'inhibition de l'expression de ces pompes à efflux n'empêcherait pas l'entrée en persistance mais pourrait favoriser l'action de certains antibiotiques sur ces bactéries. Enfin, l'expression des gènes chez les bactéries persistantes est dépendante de facteurs σ alternatifs dont σ^S et σ^E chez *E. coli*. Ces facteurs σ vont transcrire les gènes particuliers aux bactéries persistantes. Une autre stratégie thérapeutique serait donc de trouver des inhibiteurs de la liaison entre le core et ces facteurs σ alternatifs. La lipiarmycine n'est pas active sur les bactéries persistantes mais plusieurs études ont montré que son effet inhibiteur serait dépendant du facteur σ. En ce sens, son mécanisme d'action pourrait constituer un modèle permettant de comprendre comment des inhibiteurs pourraient agir de façon préférentielle sur certains facteurs σ. Une étude suggère que dans le cas de la rifampicine, la transcription dépendante de σ^{70} serait plus sensible à l'inhibiteur que la transcription dépendante de σ^{32}. La structure cristallographique du complexe ARNP-rifampicine montre que le site de liaison de la molécule est situé à proximité de la région 3 de σ. Or, contrairement aux régions 2 et 4, cette région est relativement peu conservée. Cette observation pourrait expliquer la différence d'effets rapportée selon le facteur σ. En effet, σ^{32} possède une région 3 mais celle-ci ne présente que peu d'homologie de séquence avec celle de σ^{70}. Cependant, ces résultats sont à considérer avec prudence car dans l'étude comparative deux promoteurs différents ont été utilisés pour la transcription dépendante de σ^{70} et de σ^{32}. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour vérifier la dépendance à σ de la rifampicine. Dans le cas de la lipiarmycine, qui semble également présenter une dépendance à σ, (Sonenshein, J. Bacteriol., 1977 ; Sonenshein, J. Mol. Biol., 1979 ; Osburne, J. Virol., 1980 ; article n°4) l'intégrité de la région 3.2 semble nécessaire à son action inhibitrice. Il est donc possible que cette variation joue un rôle dans le fait que la rifampicine et la lipiarmycine inhibent la transcription dépendante de σ^{70}, en phase exponentielle, mais pas la transcription dépendante des σ alternatifs intervenants chez les bactéries en « dormance ». L'étude de l'effet de la lipiarmycine sur la transcription dépendante des facteurs σ alternatifs est donc une étape nécessaire à la compréhension du mécanisme impliqué dans l'effet différentiel d'inhibiteurs selon les facteurs σ. En conclusion, une antibiothérapie efficace pourrait combiner un antibiotique conventionnel qui éliminerait les bactéries en croissance et un

antibiotique spécifique des bactéries persistantes qui inhiberait l'expression de gènes spécifiques à ces bactéries ou inhiberait la liaison des facteurs σ impliqués au core.

D'autres molécules, comme ppGpp régulent la transcription en déstabilisant les complexes ouverts. Le couple DksA/(p)ppGpp agit sur la régulation de la transcription en déplaçant l'équilibre RPc ⇆ RPi dans le sens de la dissociation pour des promoteurs intrinsèquement instables (inhibition de la transcription) et en augmentant le taux de formation des complexes ouverts pour des promoteurs intrinsèquement stables (activation de la transcription). Il a été montré que l'effet de DksA sur cet équilibre était allostérique et pouvait se propager grâce à des interactions entre DksA et les domaines « trigger loop » et/ou « bridge helix » induisant des transitions conformationnelles et affectant les éléments « switch », notamment « switch-3 ». Les éléments « switch » pouvant exister sous plusieurs conformations il est probable que ces changements des domaines « bridge helix » et « trigger loop » induisent la formation d'une nouvelle conformation au niveau des éléments « switch ». Ces changements pourraient perturber les interactions entre l'ARNP et l'ADN de manière directe ou en défavorisant l'ouverture ou la fermeture du domaine « clamp » (Rutherford, Genes Dev., 2009). De manière intéressante, ces deux modèles ont été proposés pour l'effet de la myxopyronine sur la transcription qui se lie au niveau de l'élément « switch-2 » (Mukhopahyay, Cell, 2008 ; Belogurov, Nature, 2009) et pour la lipiarmycine, à la différence près que DksA agirait sur les éléments « switch » de manière allostérique et non par liaison. L'étape précise de la transition RPc ⇆ RPi ciblée par DksA/(p)ppGpp n'a pas encore été déterminée, limitant la compréhension précise du mécanisme d'action impliqué. Des mutations qui augmentent la fréquence d'apparition des cellules persistantes chez *E. coli* ont été localisées au niveau du locus *hipA* (Moyed, J. Bacteriol., 1983). Or, RelA et SpoT semblent nécessaires à l'établissement du phénotype de persistance chez les souches hipA7 (souches qui contiennent les mutations G22S et D291A et qui, contrairement à la forme sauvage produisent une protéine non toxique), indiquant que (p)ppGpp pourrait être impliqué dans la fréquence d'apparition des persisters (Korch, Mol. Microbiol., 2003). Le mécanisme de régulation de la transcription par (p)ppGpp est également intéressant car, lors d'un stress nutritif, il induit l'utilisation préférentielle de facteurs σ alternatifs en défavorisant l'interaction core-σ^{70} et en augmentant la stabilité des facteurs σ alternatifs. Il permet par exemple l'accumulation de σ^{S} dans la cellule. Des souches mutantes pour *relA* et *spoT* ne produisant pas de ppGpp présentent une forte diminution de la production de σ^{S}. Des mutations dans la région 3.1 de σ restaurent l'accumulation de σ^{S} dans la cellule, indiquant que la déstabilisation de l'interaction core-σ^{70} provoquée par ces mutations compense l'absence de ppGpp au niveau de l'interaction core-σ^{70} (Hernandez, J. Mol. Biol., 1995). L'accumulation de σ^{S}, induite par ppGpp, se fait par l'intermédiaire de protéines différentes selon le stress nutritif impliqué. La

production de ppGpp se fait par l'intermédiaire de RelA en condition de carence en acides aminés, et par SpoT en condition de carence en carbone, phosphate, acide gras et fer. Puis, ppGpp induit l'expression de IraP qui inhibe la dégradation de σ^S par RssB. Mais, pour des carences en glucose ou d'autres nutriments, IraP ne semble pas impliquée, indiquant que la stabilisation de σ^S est régulée par de multiples voies. DksA/(p)ppGpp semblent également affecter l'activité du facteur de stress extracytoplasmique σ^E en activant directement et indirectement la transcription dépendante de ce facteur σ. Ces deux facteurs σ sont responsables de l'expression génique chez les bactéries persistantes et cela est peut-être à mettre en corrélation avec l'induction du phénotype de persistance chez les bactérie par l'intermédiaire de (p)ppGpp (Dahl, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003 ; Korch, Mol. Microbiol., 2003). Le mécanisme exact de cette induction reste largement inconnu à l'exception de l'induction d'un état de dormance par accumulation de (p)ppGpp dans la cellule. Ce mécanisme est différent de celui proposé par Keren *et al.* (Keren, J. Bacteriol., 2004) qui impliquerait les modules TA. Il constitue une nouvelle voie de formation des persisters et suggère que plusieurs mécanismes pourraient conduire à la persistance. En conséquence, l'étude approfondie de ces mécanismes permettrait de déterminer des cibles potentielles d'inhibiteurs de la voie d'induction de la persistance permettant d'empêcher le passage à cet état physiologique. Dans le cas de l'induction par (p)ppGpp, l'existence de multiples voies conduisant à l'accumulation de σ^S rend l'identification d'une telle cible difficile.

La compréhension des mécanismes d'action des inhibiteurs connus et des nouvelles molécules découvertes, ainsi que la compréhension des voies de régulation cellulaire de la transcription sont donc importantes afin d'ouvrir la voie à des stratégies thérapeutiques nouvelles, destinées à lutter efficacement contre des bactéries de plus en plus résistantes à un nombre croissant d'antibiotiques et contre les bactéries persistantes qui constituent une barrière au traitement d'un certain nombre d'infections.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-A-

Ackermann G, Löffler B, Adler D, Rodloff AC. In vitro activity of OPT-80 against Clostridium difficile. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2004) **48**: 2280-2282.

Adelman K, Yuzenkova J, La Porta A, Zenkin N, Lee J, Lis JT, Borukhov S, Wang MD, Severinov K. Molecular mechanism of transcription inhibition by peptide antibiotic Microcin J25. *Mol. Cell* (2004) **14**: 753-762.

André E, Bastide L, Michaux-Charachon S, Gouby A, Villain-Guillot P, Latouche J, Bouchet A, Gualtiéri M, Leonetti J. Novel synthetic molecules targeting the bacterial RNA polymerase assembly. *J. Antimicrob. Chemother.* (2006) **57**: 245-251.

Arcus VL, Rainey PB, Turner SJ. The PIN-domain toxin-antitoxin array in mycobacteria. *Trends Microbiol.* (2005) **13**: 360-365.

Arhin F, Bélanger O, Ciblat S, Dehbi M, Delorme D, Dietrich E, Dixit D, Lafontaine Y, Lehoux D, Liu J, McKay GA, Moeck G, Reddy R, Rose Y, Srikumar R, Tanaka KSE, Williams DM, Gros P, Pelletier J, Parr TRJ, Far AR. A new class of small molecule RNA polymerase inhibitors with activity against rifampicin-resistant Staphylococcus aureus. *Bioorg. Med. Chem.* (2006) **14**: 5812-5832.

Arthur TM, Anthony LC, Burgess RR. Mutational analysis of beta '260-309, a sigma 70 binding site located on Escherichia coli core RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* (2000) **275**: 23113-23119.

Artsimovitch I, Landick R. Pausing by bacterial RNA polymerase is mediated by mechanistically distinct classes of signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2000) **97**: 7090-7095.

Artsimovitch I, Chu C, Lynch AS, Landick R. A new class of bacterial RNA polymerase inhibitor affects nucleotide addition. *Science* (2003) **302**: 650-654.

Artsimovitch I, Patlan V, Sekine S, Vassylyeva MN, Hosaka T, Ochi K, Yokoyama S, Vassylyev DG. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* (2004) **117**: 299-310.

Artsimovitch I, Vassylyeva MN, Svetlov D, Svetlov V, Perederina A, Igarashi N, Matsugaki N, Wakatsuki S, Tahirov TH, Vassylyev DG. Allosteric modulation of the RNA polymerase catalytic reaction is an essential component of transcription control by rifamycins. *Cell* (2005) **122**: 351-363.

Attey A, Belyaeva T, Savery N, Hoggett J, Fujita N, Ishihama A, Busby S. Interactions between the cyclic AMP receptor protein and the alpha subunit of RNA polymerase at the Escherichia coli galactose operon P1 promoter. *Nucleic Acids Res.* (1994) **22**: 4375-4380.

Ayers DG, Auble DT, deHaseth PL. Promoter recognition by Escherichia coli RNA polymerase. Role of the spacer DNA in functional complex formation. *J. Mol. Biol.* (1989) **207**: 749-756.

-B-

Bar-Nahum G, Nudler E. Isolation and characterization of sigma(70)-retaining transcription elongation complexes from Escherichia coli. *Cell* (2001) **106**: 443-451.

Bar-Nahum G, Epshtein V, Ruckenstein AE, Rafikov R, Mustaev A, Nudler E. A ratchet mechanism of transcription elongation and its control. *Cell* (2005) **120**: 183-193.

Barne KA, Bown JA, Busby SJ, Minchin SD. Region 2.5 of the Escherichia coli RNA polymerase sigma70 subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *EMBO J.* (1997) **16**: 4034-4040.

Belogurov GA, Vassylyeva MN, Sevostyanova A, Appleman JR, Xiang AX, Lira R, Webber SE, Klyuyev S, Nudler E, Artsimovitch I, Vassylyev DG. Transcription inactivation through local refolding of the RNA polymerase structure. *Nature* (2009) **457**: 332-335.

Bergmann R. Thiolutin inhibits utilization of glucose and other carbon sources in cells of Escherichia coli. *Antonie Van Leeuwenhoek* (1989) **55**: 143-152.

Bigger JW. Treatment of Staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet* (1944) **14**: 497-500.

Blattner FR, Plunkett G3, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science* (1997) **277**: 1453-1462.

Borukhov S, Severinov K. Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Res. Microbiol.* (2002) **153**: 557-562.

Bown JA, Owens JT, Meares CF, Fujita N, Ishihama A, Busby SJ, Minchin SD. Organization of open complexes at Escherichia coli promoters. Location of promoter DNA sites close to region 2.5 of the sigma70 subunit of RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* (1999) **274**: 2263-2270.

Brendel V, Hamm GH, Trifonov EN. Terminators of transcription with RNA polymerase from Escherichia coli: what they look like and how to find them. *J. Biomol. Struct. Dyn.* (1986) **3**: 705-723.

Brenowitz M, Chance MR, Dhavan G, Takamoto K. Probing the structural dynamics of nucleic acids by quantitative time-resolved and equilibrium hydroxyl radical "footprinting". *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2002) **12**: 648-653.

Brodolin K, Zenkin N, Mustaev A, Mamaeva D, Heumann H. The sigma 70 subunit of RNA polymerase induces lacUV5 promoter-proximal pausing of transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2004) **11**: 551-557.

Brooun A, Liu S, Lewis K. A dose-response study of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000) **44**: 640-646.

Brown JM, Shaw KJ. A novel family of Escherichia coli toxin-antitoxin gene pairs. *J. Bacteriol.* (2003) **185**: 6600-6608.

Browning DF, Busby SJ. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* (2004) **2**: 57-65.

Bruzik JP, Auble DT, deHaseth PL. Specific activation of transcription initiation by the sequence-specific DNA-binding agents distamycin A and netropsin. *Biochemistry* (1987) **26**: 950-956.

Buck M, Gallegos MT, Studholme DJ, Guo Y, Gralla JD. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J. Bacteriol.* (2000) **182**: 4129-4136.

Burgess RR, Travers AA, Dunn JJ, Bautz EK. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* (1969) **221**: 43-46.

Burgess RR, Arthur TM, Pietz BC. Interaction of Escherichia coli sigma 70 with core RNA polymerase. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (1998) **63**: 277-287.

Burns CM, Nowatzke WL, Richardson JP. Activation of Rho-dependent transcription termination by NusG. Dependence on terminator location and acceleration of RNA release. *J. Biol. Chem.* (1999) **274**: 5245-5251.

Busby S, Ebright RH. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* (1994) **79**: 743-746.

-C-

CRUM GF, DEVRIES WH, EBLE TE, LARGE CM, SHELL JW. Streptolydigin, a new antimicrobial antibiotic. II. Isolation and characterization. *Antibiot Annu* (1955-1956) **3**: 893-896.

Camacho A, Salas M. Effect of mutations in the "extended -10" motif of three Bacillus subtilis sigmaA-RNA polymerase-dependent promoters. *J. Mol. Biol.* (1999) **286**: 683-693.

Camarero JA, Shekhtman A, Campbell EA, Chlenov M, Gruber TM, Bryant DA, Darst SA, Cowburn D, Muir TW. Autoregulation of a bacterial sigma factor explored by using segmental isotopic labeling and NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2002) **99**: 8536-8541.

Campbell EA, Korzheva N, Mustaev A, Murakami K, Nair S, Goldfarb A, Darst SA. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* (2001) **104**: 901-912.

Campbell EA, Muzzin O, Chlenov M, Sun JL, Olson CA, Weinman O, Trester-Zedlitz ML, Darst SA. Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol. Cell* (2002) **9**: 527-539.

Campbell EA, Pavlova O, Zenkin N, Leon F, Irschik H, Jansen R, Severinov K, Darst SA. Structural, functional, and genetic analysis of sorangicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *EMBO J.* (2005) **24**: 674-682.

Campbell EA, Westblade LF, Darst SA. Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* (2008) **11**: 121-127.

Carpousis AJ, Gralla JD. Cycling of ribonucleic acid polymerase to produce oligonucleotides during initiation in vitro at the lac UV5 promoter. *Biochemistry* (1980) **19**: 3245-3253.

Cassani G, Burgess RR, Goodman HM, Gold L. Inhibition of RNA polymerase by

streptolydigin. *Nature New Biol.* (1971) **230**: 197-200.

Chamberlin MJ. The selectivity of transcription. *Annu. Rev. Biochem.* (1974) **43**: 721-775.

Chatterji D, Fujita N, Ishihama A. The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *Genes Cells* (1998) **3**: 279-287.

Chen H, Tang H, Ebright RH. Functional interaction between RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain and sigma70 in UP-element- and activator-dependent transcription. *Mol. Cell* (2003) **11**: 1621-1633.

Chen J, Darst SA, Thirumalai D. Promoter melting triggered by bacterial RNA polymerase occurs in three steps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2010) **107**: 12523-12528.

Chiuchiolo MJ, Delgado MA, Farías RN, Salomón RA. Growth-phase-dependent expression of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* (2001) **183**: 1755-1764.

Ciciliato I, Corti E, Sarubbi E, Stefanelli S, Gastaldo L, Montanini N, Kurz M, Losi D, Marinelli F, Selva E. Antibiotics GE23077, novel inhibitors of bacterial RNA polymerase. I. Taxonomy, isolation and characterization. *J. Antibiot.* (2004) **57**: 210-217.

Coronelli C, White RJ, Lancini GC, Parenti F. Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes. II. Isolation, chemical, biological and biochemical characterization. *J. Antibiot.* (1975) **28**: 253-259.

Cottreau J, Baker SF, DuPont HL, Garey KW. Rifaximin: a nonsystemic rifamycin antibiotic for gastrointestinal infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* (2010) **8**: 747-760.

Cowing DW, Mecsas J, Record MT Jr, Gross, CA. Intermediates in the formation of the open complex by RNA polymerase holoenzyme containing the sigma factor sigma 32 at the groE promoter. *J. Mol. Biol.* (1989) **210**: 521-530.

Cramer P, Bushnell DA, Fu J, Gnatt AL, Maier-Davis B, Thompson NE, Burgess RR, Edwards AM, David PR, Kornberg RD. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* (2000) **288**: 640-649.

Cramer P, Bushnell DA, Kornberg RD. Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* (2001) **292**: 1863-1876.

Credito KL, Appelbaum PC. Activity of OPT-80, a novel macrocycle, compared with those of eight other agents against selected anaerobic species. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2004) **48**: 4430-4434.

-D-

DEBOER C, DIETZ A, SAVAGE GM, SILVER WS. Streptolydigin, a new antimicrobial antibiotic. I. Biologic studies of streptolydigin. *Antibiot Annu* (1955-1956) **3**: 886-892.

Dahl JL, Kraus CN, Boshoff HIM, Doan B, Foley K, Avarbock D, Kaplan G, Mizrahi V, Rubin H, Barry CE3. The role of RelMtb-mediated adaptation to stationary phase in long-term

persistence of Mycobacterium tuberculosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2003) **100**: 10026-10031.

Daniels D, Zuber P, Losick R. Two amino acids in an RNA polymerase sigma factor involved in the recognition of adjacent base pairs in the -10 region of a cognate promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1990) **87**: 8075-8079.

Darst SA. Bacterial RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2001) **11**: 155-162.

De Boer C. Streptolydigin and production thereof. *patent* (1964) **US3160560**.

Delgado MA, Rintoul MR, Farías RN, Salomón RA. Escherichia coli RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* (2001) **183**: 4543-4550.

Dhar N, McKinney JD. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. *Curr. Opin. Microbiol.* (2007) **10**: 30-38.

Dombroski AJ, Platt T. Structure of rho factor: an RNA-binding domain and a separate region with strong similarity to proven ATP-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) **85**: 2538-2542.

Dombroski AJ, Walter WA, Record MTJ, Siegele DA, Gross CA. Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* (1992) **70**: 501-512.

Dombroski AJ, Walter WA, Gross CA. Amino-terminal amino acids modulate sigma-factor DNA-binding activity. *Genes Dev.* (1993) **7**: 2446-2455.

Dombroski AJ. Recognition of the -10 promoter sequence by a partial polypeptide of sigma70 in vitro. *J. Biol. Chem.* (1997) **272**: 3487-3494.

Doundoulakis T, Xiang AX, Lira R, Agrios KA, Webber SE, Sisson W, Aust RM, Shah AM, Showalter RE, Appleman JR, Simonsen KB. Myxopyronin B analogs as inhibitors of RNA polymerase, synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2004) **14**: 5667-5672.

-E-

Ebright RH, Busby S. The Escherichia coli RNA polymerase alpha subunit: structure and function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (1995) **5**: 197-203.

Ederth J, Artsimovitch I, Isaksson LA, Landick R. The downstream DNA jaw of bacterial RNA polymerase facilitates both transcriptional initiation and pausing. *J. Biol. Chem.* (2002) **277**: 37456-37463.

Ederth J, Mooney RA, Isaksson LA, Landick R. Functional interplay between the jaw domain of bacterial RNA polymerase and allele-specific residues in the product RNA-binding pocket. *J. Mol. Biol.* (2006) **356**: 1163-1179.

Epshtein V, Cardinale CJ, Ruckenstein AE, Borukhov S, Nudler E. An allosteric path to transcription termination. *Mol. Cell* (2007) **28**: 991-1001.

Estrem ST, Gaal T, Ross W, Gourse RL. Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1998) **95**: 9761-9766.

-F-

Feklistov A, Barinova N, Sevostyanova A, Heyduk E, Bass I, Vvedenskaya I, Kuznedelov K, Merkiene E, Stavrovskaya E, Klimasauskas S, Nikiforov V, Heyduk T, Severinov K, Kulbachinskiy A. A basal promoter element recognized by free RNA polymerase sigma subunit determines promoter recognition by RNA polymerase holoenzyme. *Mol. Cell* (2006) **23**: 97-107.

Feklistov A, Mekler V, Jiang Q, Westblade LF, Irschik H, Jansen R, Mustaev A, Darst SA, Ebright RH. Rifamycins do not function by allosteric modulation of binding of Mg2+ to the RNA polymerase active center. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2008) **105**: 14820-14825.

Finegold SM, Molitoris D, Vaisanen M, Song Y, Liu C, Bolaños M. In vitro activities of OPT-80 and comparator drugs against intestinal bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2004) **48**: 4898-4902.

Fu J, Gnatt AL, Bushnell DA, Jensen GJ, Thompson NE, Burgess RR, David PR, Kornberg RD. Yeast RNA polymerase II at 5 A resolution. *Cell* (1999) **98**: 799-810.

Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol.* (2006) **4**: 36-45.

-G-

Gaal T, Ross W, Blatter EE, Tang H, Jia X, Krishnan VV, Assa-Munt N, Ebright RH, Gourse RL. DNA-binding determinants of the alpha subunit of RNA polymerase: novel DNA-binding domain architecture. *Genes Dev.* (1996) **10**: 16-26.

Gaal T, Ross W, Estrem ST, Nguyen LH, Burgess RR, Gourse RL. Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* (2001) **42**: 939-954.

Gardella T, Moyle H, Susskind MM. A mutant Escherichia coli sigma 70 subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity. *J. Mol. Biol.* (1989) **206**: 579-590.

Gerber M, Ackermann G. OPT-80, a macrocyclic antimicrobial agent for the treatment of Clostridium difficile infections: a review. *Expert Opin Investig Drugs* (2008) **17**: 547-553.

Geszvain K, Gruber TM, Mooney RA, Gross CA, Landick R. A hydrophobic patch on the flap-tip helix of E.coli RNA polymerase mediates sigma(70) region 4 function. *J. Mol. Biol.* (2004) **343**: 569-587.

Gill SC, Weitzel SE, von Hippel PH. Escherichia coli sigma 70 and NusA proteins. I. Binding interactions with core RNA polymerase in solution and within the transcription complex. *J. Mol. Biol.* (1991) **220**: 307-324.

Gnatt AL, Cramer P, Fu J, Bushnell DA, Kornberg RD. Structural basis of transcription: an

RNA polymerase II elongation complex at 3.3 A resolution. *Science* (2001) **292**: 1876-1882.

Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* (2005) **365**: 579-587.

Gourse RL, Ross W, Gaal T. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol. Microbiol.* (2000) **37**: 687-695.

Gribskov M, Burgess RR. Sigma factors from E. coli, B. subtilis, phage SP01, and phage T4 are homologous proteins. *Nucleic Acids Res.* (1986) **14**: 6745-6763.

Gries TJ, Kontur WS, Capp MW, Saecker RM, Record MT Jr. One-step DNA melting in the RNA polymerase cleft opens the initiation bubble to form an unstable open complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2010) **107:** 10418-10423.

Gruber TM, Markov D, Sharp MM, Young BA, Lu CZ, Zhong HJ, Artsimovitch I, Geszvain KM, Arthur TM, Burgess RR, Landick R, Severinov K, Gross CA. Binding of the initiation factor sigma(70) to core RNA polymerase is a multistep process. *Mol. Cell* (2001) **8**: 21-31.

Gualtieri M, Villain-Guillot P, Latouche J, Leonetti J, Bastide L. Mutation in the Bacillus subtilis RNA polymerase beta' subunit confers resistance to lipiarmycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2006a) **50**: 401-402.

Gualtieri M, Bastide L, Villain-Guillot P, Michaux-Charachon S, Latouche J, Leonetti J. In vitro activity of a new antibacterial rhodanine derivative against Staphylococcus epidermidis biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* (2006b) **58**: 778-783.

Gusarov I, Nudler E. The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol. Cell* (1999) **3**: 495-504.

-H-

Haugen SP, Berkmen MB, Ross W, Gaal T, Ward C, Gourse RL. rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell* (2006) **125**: 1069-1082.

Haugen SP, Ross W, Manrique M, Gourse RL. Fine structure of the promoter-sigma region 1.2 interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2008) **105**: 3292-3297.

Hayward RS, Igarashi K, Ishihama A. Functional specialization within the alpha-subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* (1991) **221**: 23-29.

Heisler LM, Suzuki H, Landick R, Gross CA. Four contiguous amino acids define the target for streptolydigin resistance in the beta subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* (1993) **268**: 25369-25375.

Helmann JD, Chamberlin MJ. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* (1988) **57**: 839-872.

Hernandez VJ, Cashel M. Changes in conserved region 3 of Escherichia coli sigma 70 mediate

ppGpp-dependent functions in vivo. *J. Mol. Biol.* (1995) **252**: 536-549.

Hernandez VJ, Hsu LM, Cashel M. Conserved region 3 of Escherichia coli final sigma70 is implicated in the process of abortive transcription. *J. Biol. Chem.* (1996) **271**: 18775-18779.

Heyduk E, Kuznedelov K, Severinov K, Heyduk T. A consensus adenine at position -11 of the nontemplate strand of bacterial promoter is important for nucleation of promoter melting. *J. Biol. Chem.* (2006) **281**: 12362-12369.

Hook-Barnard IG, Hinton DM. The promoter spacer influences transcription initiation via sigma70 region 1.1 of Escherichia coli RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2009) **106**: 737-742.

Huang X, Lopez de Saro FJ, Helmann JD. sigma factor mutations affecting the sequence-selective interaction of RNA polymerase with -10 region single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* (1997) **25**: 2603-2609.

-I-

Igarashi K, Fujita N, Ishihama A. Identification of a subunit assembly domain in the alpha subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* (1991a) **218**: 1-6.

Igarashi K, Ishihama A. Bipartite functional map of the E. coli RNA polymerase alpha subunit: involvement of the C-terminal region in transcription activation by cAMP-CRP. *Cell* (1991) **65**: 1015-1022.

Igarashi K, Hanamura A, Makino K, Aiba H, Aiba H, Mizuno T, Nakata A, Ishihama A. Functional map of the alpha subunit of Escherichia coli RNA polymerase: two modes of transcription activation by positive factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1991b) **88**: 8958-8962.

Irschik H, Gerth K, Höfle G, Kohl W, Reichenbach H. The myxopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from Myxococcus fulvus (Myxobacterales). *J. Antibiot.* (1983) **36**: 1651-1658.

Irschik H, Jansen R, Höfle G, Gerth K, Reichenbach H. The corallopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from Myxobacteria. *J. Antibiot.* (1985) **38**: 145-152.

Irschik H, Jansen R, Gerth K, Höfle G, Reichenbach H. The sorangicins, novel and powerful inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *J. Antibiot.* (1987) **40**: 7-13.

Irschik H, Augustiniak H, Gerth K, Höfle G, Reichenbach H. The ripostatins, novel inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *J. Antibiot.* (1995) **48**: 787-792.

Ishihama A. Functional modulation of Escherichia coli RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* (2000) **54**: 499-518.

-J-

Jimenez A, Tipper DJ, Davies J. Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular

synthesis in Saccharomyces cerevisiae. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1973) **3**: 729-738.

Jishage M, Ishihama A. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in Escherichia coli: intracellular levels of sigma 70 and sigma 38. *J. Bacteriol.* (1995) **177**: 6832-6835.

Jishage M, Iwata A, Ueda S, Ishihama A. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in Escherichia coli: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J. Bacteriol.* (1996) **178**: 5447-5451.

Joo DM, Ng N, Calendar R. A sigma32 mutant with a single amino acid change in the highly conserved region 2.2 exhibits reduced core RNA polymerase affinity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997) **94**: 4907-4912.

Joshi A, Verma M, Chakravorty M. Thiolutin-resistant mutants of Salmonella typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1982) **22**: 541-547.

-K-

Kapanidis AN, Margeat E, Ho SO, Kortkhonjia E, Weiss S, Ebright RH. Initial transcription by RNA polymerase proceeds through a DNA-scrunching mechanism. *Science* (2006) **314**: 1144-1147.

Keilman GR, Tanimoto B, Doi RH. Selective inhibition of sporulation of Bacillus subtilis by netropsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1975) **67**: 414-420.

Kenney TJ, York K, Youngman P, Moran CPJ. Genetic evidence that RNA polymerase associated with sigma A factor uses a sporulation-specific promoter in Bacillus subtilis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1989) **86**: 9109-9113.

Kent T, Kashkina E, Anikin M, Temiakov D. Maintenance of RNA-DNA hybrid length in bacterial RNA polymerases. *J. Biol. Chem.* (2009) **284**: 13497-13504.

Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* (2004) **186**: 8172-8180.

Khachatourians GG, Tipper DJ. Inhibition of messenger ribonucleic acid synthesis in Escherichia coli by thiolutin. *J. Bacteriol.* (1974) **119**: 795-804.

King RA, Markov D, Sen R, Severinov K, Weisberg RA. A conserved zinc binding domain in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase modulates intrinsic transcription termination and antitermination but does not stabilize the elongation complex. *J. Mol. Biol.* (2004) **342**: 1143-1154.

Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* (2005) **4**: 206-220.

Kolb A, Kotlarz D, Kusano S, Ishihama A. Selectivity of the Escherichia coli RNA polymerase E sigma 38 for overlapping promoters and ability to support CRP activation. *Nucleic Acids Res.* (1995) **23**: 819-826.

Komissarova N, Kashlev M. Functional topography of nascent RNA in elongation intermediates of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1998) **95**: 14699-14704.

Kontur WS, Saecker RM, Davis CA, Capp MW, Record MTJ. Solute probes of conformational changes in open complex (RPo) formation by Escherichia coli RNA polymerase at the lambdaPR promoter: evidence for unmasking of the active site in the isomerization step and for large-scale coupled folding in the subsequent conversion to RPo. *Biochemistry* (2006) **45**: 2161-2177.

Korch SB, Henderson TA, Hill TM. Characterization of the hipA7 allele of Escherichia coli and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. *Mol. Microbiol.* (2003) **50**: 1199-1213.

Korzheva N, Mustaev A, Kozlov M, Malhotra A, Nikiforov V, Goldfarb A, Darst SA. A structural model of transcription elongation. *Science* (2000) **289**: 619-625.

Kulbachinskiy A, Mustaev A. Region 3.2 of the sigma subunit contributes to the binding of the 3'-initiating nucleotide in the RNA polymerase active center and facilitates promoter clearance during initiation. *J. Biol. Chem.* (2006) **281**: 18273-18276.

Kurabachew M, Lu SHJ, Krastel P, Schmitt EK, Suresh BL, Goh A, Knox JE, Ma NL, Jiricek J, Beer D, Cynamon M, Petersen F, Dartois V, Keller T, Dick T, Sambandamurthy VK. Lipiarmycin targets RNA polymerase and has good activity against multidrug-resistant strains of Mycobacterium tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother.* (2008) **62**: 713-719.

Kuznedelov K, Korzheva N, Mustaev A, Severinov K. Structure-based analysis of RNA polymerase function: the largest subunit's rudder contributes critically to elongation complex stability and is not involved in the maintenance of RNA-DNA hybrid length. *EMBO J.* (2002) **21**: 1369-1378.

Kyzer S, Zhang J, Landick R. Inhibition of RNA polymerase by streptolydigin: no cycling allowed. *Cell* (2005) **122**: 494-496.

-L-

LEWIS C, NIKITAS CT, SCHWARTZ DF, WILKINS JR. Streptolydigin, a new antimicrobial antibiotic. III. In vitro and in vivo laboratory studies. *Antibiot Annu* (1955-1956) **3**: 897-902.

Lamond AI, Travers AA. Stringent control of bacterial transcription. *Cell* (1985) **41**: 6-8.

Lesley SA, Burgess RR. Characterization of the Escherichia coli transcription factor sigma 70: localization of a region involved in the interaction with core RNA polymerase. *Biochemistry* (1989) **28**: 7728-7734.

Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2001) **45**: 999-1007.

Lewis K. Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry Mosc.* (2005) **70**: 267-274.

Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* (2007) **5**: 48-56.

Li XY, McClure WR. Characterization of the closed complex intermediate formed during transcription initiation by Escherichia coli RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* (1998) **273**: 23549-23557.

Lira R, Xiang AX, Doundoulakis T, Biller WT, Agrios KA, Simonsen KB, Webber SE, Sisson W, Aust RM, Shah AM, Showalter RE, Banh VN, Steffy KR, Appleman JR. Syntheses of novel myxopyronin B analogs as potential inhibitors of bacterial RNA polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2007) **17**: 6797-6800.

Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin. Infect. Dis.* (2003) **36**: S11-23.

Lonetto M, Gribskov M, Gross CA. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* (1992) **174**: 3843-3849.

Lonetto MA, Rhodius V, Lamberg K, Kiley P, Busby S, Gross C. Identification of a contact site for different transcription activators in region 4 of the Escherichia coli RNA polymerase sigma70 subunit. *J. Mol. Biol.* (1998) **284**: 1353-1365.

-M-

Mae T, Hosoe K, Yamamoto T, Hidaka T, Ohashi T, Kleeman JM, Adams PE. Effect of a new rifamycin derivative, rifalazil, on liver microsomal enzyme induction in rat and dog. *Xenobiotica* (1998) **28**: 759-766.

Magnusson LU, Farewell A, Nyström T. ppGpp: a global regulator in Escherichia coli. *Trends Microbiol.* (2005) **13**: 236-242.

Majovski RC, Khaperskyy DA, Ghazy MA, Ponticelli AS. A functional role for the switch 2 region of yeast RNA polymerase II in transcription start site utilization and abortive initiation. *J. Biol. Chem.* (2005) **280**: 34917-34923.

Malhotra A, Severinova E, Darst SA. Crystal structure of a sigma 70 subunit fragment from E. coli RNA polymerase. *Cell* (1996) **87**: 127-136.

Marazzi A, Kurz M, Stefanelli S, Colombo L. Antibiotics GE23077, novel inhibitors of bacterial RNA polymerase. II. Structure elucidation. *J. Antibiot.* (2005) **58**: 260-267.

Mariani R, Granata G, Maffioli SI, Serina S, Brunati C, Sosio M, Marazzi A, Vannini A, Patel D, White R, Ciabatti R. Antibiotics GE23077, novel inhibitors of bacterial RNA polymerase. Part 3: Chemical derivatization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2005) **15**: 3748-3752.

Markov D, Naryshkina T, Mustaev A, Severinov K. A zinc-binding site in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase is involved in enzyme assembly. *Genes Dev.* (1999) **13**: 2439-2448.

Marr MT, Roberts JW. Promoter recognition as measured by binding of polymerase to nontemplate strand oligonucleotide. *Science* (1997) **276**: 1258-1260.

Mathews DE, Durbin RD. Tagetitoxin inhibits RNA synthesis directed by RNA polymerases from

chloroplasts and Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* (1990) **265**: 493-498.

Mathews DE, Durbin RD. Mechanistic aspects of tagetitoxin inhibition of RNA polymerase from Escherichia coli. *Biochemistry* (1994) **33**: 11987-11992.

McClure WR, Cech CL. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J. Biol. Chem.* (1978) **253**: 8949-8956.

McClure WR. On the mechanism of streptolydigin inhibition of Escherichia coli RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* (1980) **255**: 1610-1616.

Mekler V, Kortkhonjia E, Mukhopadhyay J, Knight J, Revyakin A, Kapanidis AN, Niu W, Ebright YW, Levy R, Ebright RH. Structural organization of bacterial RNA polymerase holoenzyme and the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell* (2002) **108**: 599-614.

Minakhin L, Bhagat S, Brunning A, Campbell EA, Darst SA, Ebright RH, Severinov K. Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2001) **98**: 892-897.

Minchin S, Busby S. Location of close contacts between Escherichia coli RNA polymerase and guanine residues at promoters either with or without consensus -35 region sequences. *Biochem. J.* (1993) **289 (Pt 3)**: 771-775.

Miropolskaya N, Artsimovitch I, Klimasauskas S, Nikiforov V, Kulbachinskiy A. Allosteric control of catalysis by the F loop of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2009) **106**: 18942-18947.

Mitchell R, Durbin R. Tagetitoxin, a toxin produced by Pseudomonas syriizgae pv. tagetis: purification and partial characterization. *Physiol. Plant Pathol.* (1981) **18**: 157-168.

Moyed HS, Bertrand KP. hipA, a newly recognized gene of Escherichia coli K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J. Bacteriol.* (1983) **155**: 768-775.

Mukhopadhyay J, Kapanidis AN, Mekler V, Kortkhonjia E, Ebright YW, Ebright RH. Translocation of sigma(70) with RNA polymerase during transcription: fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA. *Cell* (2001) **106**: 453-463.

Mukhopadhyay J, Sineva E, Knight J, Levy RM, Ebright RH. Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel. *Mol. Cell* (2004) **14**: 739-751.

Mukhopadhyay J, Das K, Ismail S, Koppstein D, Jang M, Hudson B, Sarafianos S, Tuske S, Patel J, Jansen R, Irschik H, Arnold E, Ebright RH. The RNA polymerase "switch region" is a target for inhibitors. *Cell* (2008) **135**: 295-307.

Mulligan ME, Brosius J, McClure WR. Characterization in vitro of the effect of spacer length on the activity of Escherichia coli RNA polymerase at the TAC promoter. *J. Biol. Chem.* (1985) **260**: 3529-3538.

Murakami K, Owens JT, Belyaeva TA, Meares CF, Busby SJ, Ishihama A. Positioning of two

alpha subunit carboxy-terminal domains of RNA polymerase at promoters by two transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997a) **94**: 11274-11278.

Murakami K, Kimura M, Owens JT, Meares CF, Ishihama A. The two alpha subunits of Escherichia coli RNA polymerase are asymmetrically arranged and contact different halves of the DNA upstream element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997b) **94**: 1709-1714.

Murakami KS, Masuda S, Darst SA. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 A resolution. *Science* (2002a) **296**: 1280-1284.

Murakami KS, Masuda S, Campbell EA, Muzzin O, Darst SA. Structural basis of transcription initiation: an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* (2002b) **296**: 1285-1290.

Murakami KS, Darst SA. Bacterial RNA polymerases: the wholo story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2003) **13**: 31-39.

Mustaev A, Zaychikov E, Severinov K, Kashlev M, Polyakov A, Nikiforov V, Goldfarb A. Topology of the RNA polymerase active center probed by chimeric rifampicin-nucleotide compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1994) **91**: 12036-12040.

-N-

Naji S, Bertero MG, Spitalny P, Cramer P, Thomm M. Structure-function analysis of the RNA polymerase cleft loops elucidates initial transcription, DNA unwinding and RNA displacement. *Nucleic Acids Res.* (2008) **36**: 676-687.

Naryshkin N, Revyakin A, Kim Y, Mekler V, Ebright RH. Structural organization of the RNA polymerase-promoter open complex. *Cell* (2000) **101**: 601-611.

Naryshkina T, Kuznedelov K, Severinov K. The role of the largest RNA polymerase subunit lid element in preventing the formation of extended RNA-DNA hybrid. *J. Mol. Biol.* (2006) **361**: 634-643.

Nickels BE, Garrity SJ, Mekler V, Minakhin L, Severinov K, Ebright RH, Hochschild A. The interaction between sigma70 and the beta-flap of Escherichia coli RNA polymerase inhibits extension of nascent RNA during early elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2005) **102**: 4488-4493.

Niu W, Kim Y, Tau G, Heyduk T, Ebright RH. Transcription activation at class II CAP-dependent promoters: two interactions between CAP and RNA polymerase. *Cell* (1996) **87**: 1123-1134.

Nudler E, Avetissova E, Markovtsov V, Goldfarb A. Transcription processivity: protein-DNA interactions holding together the elongation complex. *Science* (1996) **273**: 211-217.

Nudler E, Mustaev A, Lukhtanov E, Goldfarb A. The RNA-DNA hybrid maintains the register of transcription by preventing backtracking of RNA polymerase. *Cell* (1997) **89**: 33-41.

-O-

O'Neill A, Oliva B, Storey C, Hoyle A, Fishwick C, Chopra I. RNA polymerase inhibitors with activity against rifampin-resistant mutants of Staphylococcus aureus. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2000) **44**: 3163-3166.

Omura S, Imamura N, Oiwa R, Kuga H, Iwata R, Masuma R, Iwai Y. Clostomicins, new antibiotics produced by Micromonospora echinospora subsp. armeniaca subsp. nov. I. Production, isolation, and physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* (1986) **39**: 1407-1412.

Oppolzer W, Prelog V, Sensi P. [The composition of rifamycin B and related rifamycins]. *Experientia* (1964) **20**: 336-339.

Osburne MS, Sonenshein AL. Inhibition by lipiarmycin of bacteriophage growth in Bacillus subtilis. *J. Virol.* (1980) **33**: 945-953.

-P-

Paget MSB, Helmann JD. The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol.* (2003) **4**: 203.

Panaghie G, Aiyar SE, Bobb KL, Hayward RS, de Haseth PL. Aromatic amino acids in region 2.3 of Escherichia coli sigma 70 participate collectively in the formation of an RNA polymerase-promoter open complex. *J. Mol. Biol.* (2000) **299**: 1217-1230.

Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* (2005) **33**: 966-976.

Parenti F, Pagani H, Beretta G. Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes. I. Description of the producer strain and fermentation studies. *J. Antibiot.* (1975) **28**: 247-252.

Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov* (2007) **6**: 29-40.

Pedersen K, Zavialov AV, Pavlov MY, Elf J, Gerdes K, Ehrenberg M. The bacterial toxin RelE displays codon-specific cleavage of mRNAs in the ribosomal A site. *Cell* (2003) **112**: 131-140.

Pemberton IK, Muskhelishvili G, Travers AA, Buckle M. The G+C-rich discriminator region of the tyrT promoter antagonises the formation of stable preinitiation complexes. *J. Mol. Biol.* (2000) **299**: 859-864.

Platt T. Transcription termination and the regulation of gene expression. *Annu. Rev. Biochem.* (1986) **55**: 339-372.

Polyakov A, Richter C, Malhotra A, Koulich D, Borukhov S, Darst SA. Visualization of the binding site for the transcript cleavage factor GreB on Escherichia coli RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* (1998) **281**: 465-473.

Potrykus K, Cashel M. (p)ppGpp: still magical?. *Annu. Rev. Microbiol.* (2008) **62**: 35-51.

Prelog V, Oppolzer W. [Ansamycins, a novel class of microbial metabolites]. *Helv. Chim. Acta*

(1973) **56**: 1179-1187.

Prescott LM, Harley JP, Klein DA. . *Microbiologie* (2003) **2e édition**: 993.

Pupov D, Miropolskaya N, Sevostyanova A, Bass I, Artsimovitch I, Kulbachinskiy A. Multiple roles of the RNA polymerase {beta}' SW2 region in transcription initiation, promoter escape, and RNA elongation. *Nucleic Acids Res.* (2010).

Pérez-Rueda E, Collado-Vides J. The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in Escherichia coli K-12. *Nucleic Acids Res.* (2000) **28**: 1838-1847.

-R-

Reddy PS, Raghavan A, Chatterji D. Evidence for a ppGpp-binding site on Escherichia coli RNA polymerase: proximity relationship with the rifampicin-binding domain. *Mol. Microbiol.* (1995) **15**: 255-265.

Rees WA, Keller RW, Vesenka JP, Yang G, Bustamante C. Evidence of DNA bending in transcription complexes imaged by scanning force microscopy. *Science* (1993) **260**: 1646-1649.

Reppas NB, Wade JT, Church GM, Struhl K. The transition between transcriptional initiation and elongation in E. coli is highly variable and often rate limiting. *Mol. Cell* (2006) **24**: 747-757.

Revyakin A, Liu C, Ebright RH, Strick TR. Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. *Science* (2006) **314**: 1139-1143.

Ring BZ, Yarnell WS, Roberts JW. Function of E. coli RNA polymerase sigma factor sigma 70 in promoter-proximal pausing. *Cell* (1996) **86**: 485-493.

Rogozina A, Zaychikov E, Buckle M, Heumann H, Sclavi B. DNA melting by RNA polymerase at the T7A1 promoter precedes the rate-limiting step at 37 degrees C and results in the accumulation of an off-pathway intermediate. *Nucleic Acids Res.* (2009) **37**: 5390-5404.

Rosenberg M, Court D. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* (1979) **13**: 319-353.

Ross W, Schneider DA, Paul BJ, Mertens A, Gourse RL. An intersubunit contact stimulating transcription initiation by E coli RNA polymerase: interaction of the alpha C-terminal domain and sigma region 4. *Genes Dev.* (2003) **17**: 1293-1307.

Ross W, Gourse RL. Sequence-independent upstream DNA-alphaCTD interactions strongly stimulate Escherichia coli RNA polymerase-lacUV5 promoter association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2005) **102**: 291-296.

Rothstein DM, van Duzer J, Sternlicht A, Gilman SC. Rifalazil and other benzoxazinorifamycins in the treatment of chlamydia-based persistent infections. *Arch. Pharm. (Weinheim)* (2007) **340**: 517-529.

Rutherford ST, Villers CL, Lee J, Ross W, Gourse RL. Allosteric control of Escherichia coli rRNA promoter complexes by DksA. *Genes Dev.* (2009) **23**: 236-248.

Römmele G, Wirz G, Solf R, Vosbeck K, Gruner J, Wehrli W. Resistance of Escherichia coli to rifampicin and sorangicin A--a comparison. *J. Antibiot.* (1990) **43**: 88-91.

-S-

SENSI P, GRECO AM, BALLOTTA R. Rifomycin. I. Isolation and properties of rifomycin B and rifomycin complex. *Antibiot Annu* (1959-1960) **7**: 262-270.

Saecker RM, Tsodikov OV, McQuade KL, Schlax PEJ, Capp MW, Record MTJ. Kinetic studies and structural models of the association of E. coli sigma(70) RNA polymerase with the lambdaP(R) promoter: large scale conformational changes in forming the kinetically significant intermediates. *J. Mol. Biol.* (2002) **319**: 649-671.

Salomón RA, Farías RN. Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by Escherichia coli. *J. Bacteriol.* (1992) **174**: 7428-7435.

Salomón RA, Farías RN. The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *J. Bacteriol.* (1993) **175**: 7741-7742.

Salomón RA, Farías RN. The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. *J. Bacteriol.* (1995) **177**: 3323-3325.

Sarkar N, Langley D, Paulus H. Biological function of gramicidin: selective inhibition of RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1977) **74**: 1478-1482.

Sarubbi E, Monti F, Corti E, Miele A, Selva E. Mode of action of the microbial metabolite GE23077, a novel potent and selective inhibitor of bacterial RNA polymerase. *Eur. J. Biochem.* (2004) **271**: 3146-3154.

Sclavi B, Zaychikov E, Rogozina A, Walther F, Buckle M, Heumann H. Real-time characterization of intermediates in the pathway to open complex formation by Escherichia coli RNA polymerase at the T7A1 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2005) **102**: 4706-4711.

Seneca H, Kane JH, Rockenbach J. Bactericidal, protozoicidal and fungicidal properties of thiolutin. *Antibiot Chemother* (1952) **2**: 357-360.

Sergio S, Pirali G, White R, Parenti F. Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes III. Mechanism of action. *J. Antibiot.* (1975) **28**: 543-549.

Severinov K, Fenyö D, Severinova E, Mustaev A, Chait BT, Goldfarb A, Darst SA. The sigma subunit conserved region 3 is part of "5'-face" of active center of Escherichia coli RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* (1994) **269**: 20826-20828.

Severinov K, Markov D, Severinova E, Nikiforov V, Landick R, Darst SA, Goldfarb A. Streptolydigin-resistant mutants in an evolutionarily conserved region of the beta' subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* (1995) **270**: 23926-23929.

Severinov K. RNA polymerase structure-function: insights into points of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* (2000) **3**: 118-125.

Severinova E, Severinov K, Fenyö D, Marr M, Brody EN, Roberts JW, Chait BT, Darst SA. Domain organization of the Escherichia coli RNA polymerase sigma 70 subunit. *J. Mol. Biol.* (1996) **263**: 637-647.

Shah D, Zhang Z, Khodursky A, Kaldalu N, Kurg K, Lewis K. Persisters: a distinct physiological state of E. coli. *BMC Microbiol.* (2006) **6**: 53.

Sharp MM, Chan CL, Lu CZ, Marr MT, Nechaev S, Merritt EW, Severinov K, Roberts JW, Gross CA. The interface of sigma with core RNA polymerase is extensive, conserved, and functionally specialized. *Genes Dev.* (1999) **13**: 3015-3026.

Schickor P, Metzger W, Werel W, Lederer H, Heumann H. Topography of intermediates in transcription initiation of E.coli. *EMBO J* (1990) **9**: 2215-2220

Siddhikol C, Erbstoeszer JW, Weisblum B. Mode of action of streptolydigin. *J. Bacteriol.* (1969) **99**: 151-155.

Siegele DA, Hu JC, Walter WA, Gross CA. Altered promoter recognition by mutant forms of the sigma 70 subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* (1989) **206**: 591-603.

Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SJ, He H, Clardy J, Handelsman J. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by Bacillus cereus UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* (1994) **60**: 2023-2030.

Sivasubramanian N, Jayaraman R. Thiolutin resistant mutants of Escherichia coli are they RNA chain initiation mutants?. *Mol. Gen. Genet.* (1976) **145**: 89-96.

Sonenshein AL, Alexander HB, Rothstein DM, Fisher SH. Lipiarmycin-resistant ribonucleic acid polymerase mutants of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* (1977) **132**: 73-79.

Sonenshein AL, Alexander HB. Initiation of transcription in vitro inhibited by lipiarmycin. *J. Mol. Biol.* (1979) **127**: 55-72.

Sosunov V, Sosunova E, Mustaev A, Bass I, Nikiforov V, Goldfarb A. Unified two-metal mechanism of RNA synthesis and degradation by RNA polymerase. *EMBO J.* (2003) **22**: 2234-2244.

Studitsky V, Brodolin K, Liu Y, Mirzabekov A. Topography of lacUV5 initiation complexes. *Nucleic Acids Res.* (2001) **29**: 854-861.

Srivatsan A, Wang JD. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr. Opin. Microbiol.* (2008) **11**: 100-105.

Stabb EV, Jacobson LM, Handelsman J. Zwittermicin A-producing strains of Bacillus cereus from diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.* (1994) **60**: 4404-4412.

Stabb EV, Handelsman J. Genetic analysis of zwittermicin A resistance in Escherichia coli: effects on membrane potential and RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* (1998) **27**: 311-322.

Steinberg TH, Mathews DE, Durbin RD, Burgess RR. Tagetitoxin: a new inhibitor of eukaryotic transcription by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* (1990) **265**: 499-505.

Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int. J. Med. Microbiol.* (2002) **292**: 107-113.

Stragier P, Parsot C, Bouvier J. Two functional domains conserved in major and alternate bacterial sigma factors. *FEBS Lett.* (1985) **187**: 11-15.

Studholme DJ, Buck M. The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in bacteria: insights from genome sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* (2000) **186**: 1-9.

Sullivan KM, Spooner LM. Fidaxomicin: a macrocyclic antibiotic for the management of Clostridium difficile infection. *Ann Pharmacother* (2010) **44**: 352-359.

Swanson RN, Hardy DJ, Shipkowitz NL, Hanson CW, Ramer NC, Fernandes PB, Clement JJ. In vitro and in vivo evaluation of tiacumicins B and C against Clostridium difficile. *Antimicrob. Agents Chemother.* (1991) **35**: 1108-1111.

-T-

Talpaert M, Campagnari F, Clerici L. Lipiarmycin: an antibiotic inhibiting nucleic acid polymerases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1975) **63**: 328-334.

Tedin K, Bremer H. Toxic effects of high levels of ppGpp in Escherichia coli are relieved by rpoB mutations. *J. Biol. Chem.* (1992) **267**: 2337-2344.

Temiakov D, Zenkin N, Vassylyeva MN, Perederina A, Tahirov TH, Kashkina E, Savkina M, Zorov S, Nikiforov V, Igarashi N, Matsugaki N, Wakatsuki S, Severinov K, Vassylyev DG. Structural basis of transcription inhibition by antibiotic streptolydigin. *Mol. Cell* (2005) **19**: 655-666.

Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control* (2006) **34**: S3-10; discussion S64-73.

Theriault RJ, Karwowski JP, Jackson M, Girolami RL, Sunga GN, Vojtko CM, Coen LJ. Tiacumicins, a novel complex of 18-membered macrolide antibiotics. I. Taxonomy, fermentation and antibacterial activity. *J. Antibiot.* (1987) **40**: 567-574.

Tipper DJ. Inhibition of yeast ribonucleic acid polymerases by thiolutin. *J. Bacteriol.* (1973) **116**: 245-256.

Toulokhonov II, Shulgina I, Hernandez VJ. Binding of the transcription effector ppGpp to Escherichia coli RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the beta'-subunit. *J. Biol. Chem.* (2001) **276**: 1220-1225.

Toulokhonov I, Landick R. The flap domain is required for pause RNA hairpin inhibition of catalysis by RNA polymerase and can modulate intrinsic termination. *Mol. Cell* (2003) **12**: 1125-1136.

Toulokhonov I, Landick R. The role of the lid element in transcription by E. coli RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* (2006) **361**: 644-658.

Travers AA. Promoter sequence for stringent control of bacterial ribonucleic acid synthesis. *J. Bacteriol.* (1980) **141**: 973-976.

Tuske S, Sarafianos SG, Wang X, Hudson B, Sineva E, Mukhopadhyay J, Birktoft JJ, Leroy O, Ismail S, Clark ADJ, Dharia C, Napoli A, Laptenko O, Lee J, Borukhov S, Ebright RH, Arnold E. Inhibition of bacterial RNA polymerase by streptolydigin: stabilization of a straight-bridge-helix active-center conformation. *Cell* (2005) **122**: 541-552.

-U-

Uptain SM, Kane CM, Chamberlin MJ. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* (1997) **66**: 117-172.

-V-

Vassylyev DG, Sekine S, Laptenko O, Lee J, Vassylyeva MN, Borukhov S, Yokoyama S. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 A resolution. *Nature* (2002) **417**: 712-719.

Vassylyev DG, Svetlov V, Vassylyeva MN, Perederina A, Igarashi N, Matsugaki N, Wakatsuki S, Artsimovitch I. Structural basis for transcription inhibition by tagetitoxin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2005) **12**: 1086-1093.

Vassylyev DG, Vassylyeva MN, Zhang J, Palangat M, Artsimovitch I, Landick R. Structural basis for substrate loading in bacterial RNA polymerase. *Nature* (2007a) **448**: 163-168.

Vassylyev DG, Vassylyeva MN, Perederina A, Tahirov TH, Artsimovitch I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature* (2007b) **448**: 157-162.

Villain-Guillot P, Gualtieri M, Bastide L, Leonetti J. In vitro activities of different inhibitors of bacterial transcription against Staphylococcus epidermidis biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2007) **51**: 3117-3121.

Voskuil MI, Chambliss GH. The TRTGn motif stabilizes the transcription initiation open complex. *J. Mol. Biol.* (2002) **322**: 521-532.

Vrentas CE, Gaal T, Berkmen MB, Rutherford ST, Haugen SP, Vassylyev DG, Ross W, Gourse RL. Still looking for the magic spot: the crystallographically defined binding site for ppGpp on RNA polymerase is unlikely to be responsible for rRNA transcription regulation. *J. Mol. Biol.* (2008) **377**: 551-564.

Vuthoori S, Bowers CW, McCracken A, Dombroski AJ, Hinton DM. Domain 1.1 of the sigma(70) subunit of Escherichia coli RNA polymerase modulates the formation of stable polymerase/promoter complexes. *J. Mol. Biol.* (2001) **309**: 561-572.

-W-

Waldburger C, Gardella T, Wong R, Susskind MM. Changes in conserved region 2 of Escherichia coli sigma 70 affecting promoter recognition. *J. Mol. Biol.* (1990) **215**: 267-276.

Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* (2000) **406**: 775-781.

Walsh C. Where will new antibiotics come from?. *Nat. Rev. Microbiol.* (2003) **1**: 65-70.

Wang D, Severinov K, Landick R. Preferential interaction of the his pause RNA hairpin with RNA polymerase beta subunit residues 904-950 correlates with strong transcriptional pausing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1997) **94**: 8433-8438.

Wegrzyn A, Szalewska-Pałasz A, Błaszczak A, Liberek K, Wegrzyn G. Differential inhibition of transcription from sigma70- and sigma32-dependent promoters by rifampicin. *FEBS Lett.* (1998) **440**: 172-174.

Westover KD, Bushnell DA, Kornberg RD. Structural basis of transcription: nucleotide selection by rotation in the RNA polymerase II active center. *Cell* (2004) **119**: 481-489.

Wigneshweraraj SR, Burrows PC, Nechaev S, Zenkin N, Severinov K, Buck M. Regulated communication between the upstream face of RNA polymerase and the beta' subunit jaw domain. *EMBO J.* (2004) **23**: 4264-4274.

Wigneshweraraj SR, Burrows PC, Severinov K, Buck M. Stable DNA opening within open promoter complexes is mediated by the RNA polymerase beta'-jaw domain. *J. Biol. Chem.* (2005) **280**: 36176-36184.

Wilson C, Dombroski AJ. Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by Escherichia coli RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* (1997) **267**: 60-74.

Wilson K, Kalkum M, Ottesen J, Yuzenkova J, Chait BT, Landick R, Muir T, Severinov K, Darst SA. Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *J. Am. Chem. Soc.* (2003) **125**: 12475-12483.

Wiuff C, Zappala RM, Regoes RR, Garner KN, Baquero F, Levin BR. Phenotypic tolerance: antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2005) **49**: 1483-1494.

-X-

Xu M, Zhou YN, Goldstein BP, Jin DJ. Cross-resistance of Escherichia coli RNA polymerases conferring rifampin resistance to different antibiotics. *J. Bacteriol.* (2005) **187**: 2783-2792.

-Y-

Young BA, Anthony LC, Gruber TM, Arthur TM, Heyduk E, Lu CZ, Sharp MM, Heyduk T, Burgess RR, Gross CA. A coiled-coil from the RNA polymerase beta' subunit allosterically induces selective nontemplate strand binding by sigma(70). *Cell* (2001) **105**: 935-944.

Young BA, Gruber TM, Gross CA. Views of transcription initiation. *Cell* (2002) **109**: 417-420.

Young BA, Gruber TM, Gross CA. Minimal machinery of RNA polymerase holoenzyme sufficient for promoter melting. *Science* (2004) **303**: 1382-1384.

Yuzenkova J, Delgado M, Nechaev S, Savalia D, Epshtein V, Artsimovitch I, Mooney RA, Landick R, Farias RN, Salomon R, Severinov K. Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin j25. *J. Biol. Chem.* (2002) **277**: 50867-50875.

Yuzenkova Y, Zenkin N. Central role of the RNA polymerase trigger loop in intrinsic RNA hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2010) **107**: 10878-10883.

-Z-

Zenkin N, Severinov K. The role of RNA polymerase sigma subunit in promoter-independent initiation of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2004) **101**: 4396-4400.

Zenkin N, Yuzenkova Y, Severinov K. Transcript-assisted transcriptional proofreading. *Science* (2006) **313**: 518-520.

Zenkin N, Kulbachinskiy A, Yuzenkova Y, Mustaev A, Bass I, Severinov K, Brodolin K. Region 1.2 of the RNA polymerase sigma subunit controls recognition of the -10 promoter element. *EMBO J.* (2007) **26**: 955-964.

Zhang G, Campbell EA, Minakhin L, Richter C, Severinov K, Darst SA. Crystal structure of Thermus aquaticus core RNA polymerase at 3.3 A resolution. *Cell* (1999) **98**: 811-824.

Inhibiteurs de la transcription bactérienne : étude du mécanisme d'action de la lipiarmycine et dépendance au facteur de transcription σ

Résumé:

Le nombre croissant de bactéries résistantes aux antibiotiques et le problème des cellules persistantes rend urgent le développement de nouveaux antibiotiques et la compréhension de leur mécanisme d'action. L'ARN polymérase est l'enzyme centrale de la transcription et est une cible intéressante pour les antibiotiques. Dans cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à un inhibiteur de l'ARN polymérase : la lipiarmycine. Il s'agit d'un inhibiteur de la transcription macrocyclique qui inhibe les bactéries à Gram + et qui est en essai clinique de phase III pour le traitement des infections liées à Clostridium difficile. L'objectif de ce travail a été de déterminer le mécanisme d'action de la lipiarmycine ainsi que le mécanisme de résistance à la molécule. Pour cela, nous avons dans un premier temps précisé et modélisé son site de liaison sur l'ARN polymérase. Puis, dans un deuxième temps, nous avons utilisé des approches génétiques et biochimiques afin de déterminer son mécanisme et l'effet de certaines mutations sur la transcription. Ces travaux ont mis à jour un nouveau mécanisme d'inhibition de la transcription.

Mots clés : Transcription bactérienne, ARN polymérase, Inhibiteurs, Résistance bactérienne.

Inhibitors of bacterial transcription: study of the mechanism of action of lipiarmycin and dependence on transcription factor σ

Abstract:

The growing number of antibiotic-resistant bacteria added to the problem caused by persistent cells stress the need for developing new antibiotics and for understanding their mechanism of action. RNA polymerase is the main enzyme of the transcription process and is an interesting target for antibiotics. In this study we focus on a particular inhibitor of RNA polymerase : lipiarmycin. It is a macrocyclic inhibitor of transcription inhibiting Gram + bacteria that is developed in phase III clinical trials for treatment of Clostridium difficile infections. The objective of this work was to determine the mechanism of action of lipiarmycin and the mechanism confering resistance against the molecule. We first define more precisely its binding site on RNA polymerase and then used genetic and biochemical approaches to determine its mechanism of action and the effect of some specific mutations on transcription. Our experiments reveal a new mechanism of transcription inhibitor action.

Key Words : Bacterial transcription, RNA polymerase, Inhibitors, Bacterial resistance.