



**HAL**  
open science

# Rôle de la sous-unité sigma de l'ARN polymérase bactérienne dans la tolérance aux antibiotiques

Zakia Benabad

► **To cite this version:**

Zakia Benabad. Rôle de la sous-unité sigma de l'ARN polymérase bactérienne dans la tolérance aux antibiotiques. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT064 . tel-01557507

**HAL Id: tel-01557507**

**<https://theses.hal.science/tel-01557507>**

Submitted on 6 Jul 2017

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

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

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
**Docteur**

Délivré par l'**Université de MONTPELLIER**

Préparée au sein de l'école doctorale CBS2 - Sciences Chimiques  
et Biologiques pour la Santé (ED 168)  
et de l'unité de recherche CPBS-CNRS

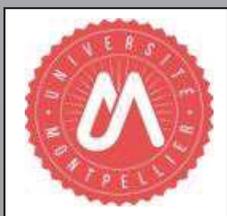
Spécialité : Biologie Santé

Présentée par Zakia BENABAD

**Rôle de la sous-unité sigma de l'ARN polymérase  
bactérienne dans la tolérance aux antibiotiques**

Soutenue le 17 novembre 2016 devant le jury composé de

Dr. Bianca SCLAVI, CR, CNRS, Cachan	Rapporteur
Dr. Rachid RAHMOUNI, DR, CNRS, Orléans	Rapporteur
Dr. Jean-Paul LEONETTI, DR, DEINOVE, Montpellier	Examineur
Dr. Emmanuel CORNILLOT, Pr, UM, Montpellier	Examineur
Dr. Konstantin BRODOLIN, CR, INSERM, Montpellier	Directeur de thèse





# REMERCIEMENTS

Une thèse de doctorat est l'aboutissement d'une longue formation au cours de laquelle interviennent plusieurs organismes et plusieurs personnalités.

Cette thèse représente une étape importante pour moi. Elle est une forme de consécration de nombreuses années d'études et de recherches. Elle nécessite une forte motivation pour se lancer dans cette aventure et surmonter tous les obstacles. Fort heureusement, le plaisir de voir les résultats de son travail se concrétiser est un encouragement fort. Mais une thèse est aussi une œuvre collective.

Je tiens à exprimer ma gratitude à tous celles et ceux qui m'ont formé et guidé à travers ce long parcours universitaire et professionnel jusqu'à son aboutissement.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Konstantin Brodolin d'avoir assuré la direction scientifique de cette thèse. Ses compétences scientifiques, sa disponibilité et son soutien tout au long de mon travail ont été mon meilleur appui. Je le remercie également de m'avoir fait faire partager son enthousiasme. Les qualités humaines qu'il a manifestées tout au long de la réalisation de cette thèse, la confiance qu'il a placée en moi, m'ont encouragée à poursuivre dans cette voie.

Je lui témoigne une profonde estime et une sincère reconnaissance. Je le remercie aussi pour tout ce qu'il a apporté à ce travail par son recul scientifique et par ses précieux conseils. Il m'a appris la rigueur de l'analyse scientifique et m'a accompagnée dans le monde de la recherche. Je lui souhaite le meilleur, tant d'un point de vue professionnel que personnel. Encore merci pour tout.

Je tiens également à exprimer mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci au Dr. Bianca Scavi et au Dr. Rachid Rahmouni d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci également au Dr. Jean-Paul Léonetti et au Professeur Emmanuel Cornillot d'avoir examiné mon mémoire.

Je remercie le Directeur du CPBS Mr Jean-Michel Mesnard ainsi que le Directeur Adjoint Mr Stephan Köhler.

Je remercie la Déléguée Régionale Mme Ghislaine Gibello et Mme Gladys Maure responsable des Ressources Humaines ainsi que Anne -Marie Bergé et Fanny Latorre conseillères formation de leur aide pour la prise en charge du financement de mes formations et de mon inscription à l'Université.

Merci également à la Cellule Support : Pierre Diamante, Christine Gagnere, Sandrine Peired et Martine Michaud de m'avoir facilité toutes les démarches administratives.

Merci à Mr Christian Devaux et Mme Nathalie Pasqualini de leur appui auprès de la délégation Languedoc Roussillon.

J'ai été très heureuse de l'accompagnement de toute l'équipe Transcription et Résistances aux Antibiotiques lors de la préparation de cette thèse. Merci infiniment à Corinne Lionne, à Laurent Chaloin, à Rahila et à Ayya pour leur bonne humeur, leur aide et pour tous nos échanges au cours de nos réunions d'équipe.

Enfin, il m'est donné ici l'occasion d'exprimer toute ma reconnaissance à ma famille pour leur présence et pour leur amour.

Je voudrais tout d'abord remercier mes parents et mes frères et sœurs à qui je dois tout et qui ont toujours cru en moi. Leur soutien a toujours été généreux et chaleureux, ils m'ont toujours encouragé et m'ont appris à ne jamais baisser les bras. Ils m'ont transmis le désir d'apprendre et le plaisir de la recherche.

Je pense bien sûr à mes enfants Sarah et Julien en espérant ne pas avoir été trop absente pendant ces longs mois de rédaction. Mais je ne suis pas trop inquiète sur cette question car ils étaient probablement ravis d'être tranquilles.

Mais je voudrais surtout dire toute ma compassion à celui qui a subi des mois et des mois d'explications interminables sur l'ARNP.

Je parle bien sûr de mon mari qui a, par ignorance de la charge de travail, accepté mon choix. Je le remercie infiniment pour son soutien quotidien et surtout pour sa patience pour me reconforter et m'encourager pendant les moments d'angoisse, de doute et de faiblesse. Cette thèse est aussi la sienne.

# TABLE DES MATIERES

---

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	3
<b>LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES</b> .....	8
<b>ABREVIATIONS</b> .....	8
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	10
<b>CHAPITRE I : INTRODUCTION</b> .....	14
<b>A. L'ARN polymérase cible potentielle de la recherche de nouveaux antibiotiques</b> .....	15
A.I) Généralités sur les antibiotiques.....	15
A.II) Emergence de bactéries résistantes.....	17
A.III) Transmissions des résistances aux antibiotiques.....	18
A.III.1 Résistances naturelles.....	18
A.III.2 Résistances acquises.....	19
A.IV) Mécanismes des résistances aux antibiotiques.....	20
A.IV.1 Altération de l'antibiotique.....	20
A.IV.2 Modification de la cible.....	21
A.IV.3 Réduction de la perméabilité.....	21
A.IV.4 Mécanisme d'expulsion des antibiotiques.....	21
A.V) Recherche de nouvelles voies.....	22
A.VI) L'ARN polymérase est une cible des antibiotiques.....	23
<b>B. L'ARN polymérase</b> .....	25
B.I) Core de l'ARN polymérase (E).....	25
B.II) L'holoenzyme ( $E\sigma$ ).....	27
B.II.1 Facteurs de transcription sigma ( $\sigma$ ).....	29
B.II.2 Les facteurs sigma peuvent être classés en deux familles :.....	29
B.II.3 Principaux domaines structuraux des facteurs sigma.....	32
B.II.4 Différents types de promoteurs reconnus par le facteur $\sigma$ . figure.....	40
<b>C. Cycle de transcription</b> .....	44
C.I) Initiation.....	44
C.I.1 Formation du complexe fermé : R <sub>P</sub> c.....	44

C.I.2 Etapes intermédiaires entre RPc et RPo .....	46
C.I.3 Formation du complexe ouvert.....	48
C.II) Initiation abortive.....	50
C.III) Elongation .....	51
C.IV) Terminaison .....	53
C.IV.1 Terminaison intrinsèque .....	53
C.IV.2 Terminaison dépendante du facteur Rho .....	54
C.V) Rôle du couple Dksa/ppGpp dans la régulation de la transcription .....	55
C.V.1 DksA .....	55
C.V.2 ppGpp.....	56
C.V.3 Effet synergique de Dksa et de ppGpp.....	57
<b>D. Inhibiteurs de l'ARN polymérase.....</b>	<b>59</b>
D.I) Antibiotiques ciblant l'extension de l'ARN (Figure 19).....	60
D.I.1 Ansamycines (rifamycines) .....	60
D.I.2 Sorangicine.....	62
D.II) Antibiotiques ciblant le site catalytique de l'ARN polymérase.....	63
D.II.1 Streptolydigne .....	63
D.II.2 Microcine J25 .....	65
D.II.3 Série CBR703 .....	66
D.II.4 Salinamide.....	68
D.II.5 Peptide GE23077.....	69
D.II.6 Tagetitoxine .....	71
D.III) Les inhibiteurs bloquent la formation du complexe ouvert (Figure 22).....	73
D.III.1 Myxopyronine .....	73
D.III.2 Corallopyronine.....	74
D.III.3 Ripostatine .....	75
D.III.4 Lipiarmycine .....	76
D.III.5 Ureidothiophène.....	78
D.IV) Les inhibiteurs de l'interaction entre le core de l'ARNP et la sous-unité $\sigma$ .....	80

D.IV.1 Composés SB.....	81
D.IV.2 Composés GKL .....	82
D.IV.3 Composé DSHS00507 .....	82
<b>Article n°1 .....</b>	<b>84</b>
<b>CHAPITRE II : RESULTATS.....</b>	<b>89</b>
A. Introduction .....	90
B. Résultats.....	91
B.I) Sigma S ( $\sigma^S$ ) possède les mêmes propriétés que les mutants au niveau de la région 3.2 .....	97
B.II) Effet des mutations sur l'inhibition par la lipiarmycine .....	99
B.III) La substitution E116G dans la région 1.2 de $\sigma^{70}$ augmente la sensibilité de l'ARNP à Lpm....	99
B.IV) L'hétéroduplex de l'ADN dans le promoteur lac UV5 abolit l'action de la Lpm .....	100
B.V) La délétion de la région 3.2 et la lipiarmycine déstabilisent les interactions entre l'ARNP et l'ADN aval. ....	103
B.VI) Les régions 1.2 et 3.2 de $\sigma^{70}$ modulent la sensibilité au froid au cours de la fusion du promoteur .....	106
C. Simulations de dynamique moléculaire (DM) et le Docking.....	112
C.I) Simulations de dynamique moléculaire.....	112
C.II) Docking.....	117
D. Conclusions .....	120
<b>Article n°2 .....</b>	<b>121</b>
<b>CHAPITRE III : DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>135</b>
A. Discussion.....	136
B. Perspectives .....	141
MATERIELS ET METHODES .....	142
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	145

# LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

## F

<b>Figure 1.</b> Historique de la découverte des antibiotiques	16
<b>Figure 2.</b> Dissémination des antibiotiques dans l'environnement,	18
<b>Figure 3.</b> Les trois mécanismes de transfert génétique horizontal (HGT) chez les bactéries	20
<b>Figure 4.</b> Les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries	21
<b>Figure 5.</b> Structure globale du core de l'ARNP de <i>T. thermophilus</i> avec l'ADN	27
<b>Figure 6.</b> Structure de l'holoenzyme de <i>T. thermophilus</i> avec le facteur sigma	28
<b>Figure 7.</b> Représentation schématique de la structure des différents groupes de facteurs $\sigma$	30
<b>Figure 8.</b> Interactions entre les régions conservées du $\sigma^{70}$	32
<b>Figure 9.</b> Structure de l'holoenzyme d' <i>E.coli</i> comportant $\sigma^{70}$	33
<b>Figure 10.</b> Structure du facteur sigma 70	34
<b>Figure 11.</b> Différents types de promoteurs bactériens	43
<b>Figure 12.</b> Différentes étapes du cycle de transcription procaryote	44
<b>Figure 13.</b> Représentation schématique du complexe fermé	45
<b>Figure 14.</b> Représentation schématique du complexe intermédiaire	47
<b>Figure 15.</b> Représentation schématique du positionnement de l'ADN	50
<b>Figure 16.</b> Modèle de terminaison intrinsèque	54
<b>Figure 17.</b> Représentation du mouvement du facteur Rho: (PBS)	55
<b>Figure 18.</b> Les inhibiteurs des différentes étapes du cycle de transcription	59
<b>Figure 19.</b> Structure chimique des inhibiteurs ciblant l'extension de l'ARN	63
<b>Figure 20.</b> Représentation schématique des contacts entre l'ARNP et l'inhibiteur CBR	67
<b>Figure 21.</b> Structure chimique des inhibiteurs ciblant le site catalytique de l'ARN polymérase	72
<b>Figure 22.</b> Structure chimique des inhibiteurs de l'ARNP ciblant le domaine switch-2	79
<b>Figure 23.</b> Structure chimique des inhibiteurs ciblant l'interaction	83
<b>Figure 24.</b> Positionnement des mutations de la sous-unité $\sigma$ dans la structure de l'ARNP	93
<b>Figure 25.</b> Alignement de la séquence de la région 3.2 selon les groupes de sigma	94
<b>Figure 26.</b> Structure des promoteurs <i>lacUV5</i> et T7A1	94
<b>Figure 27.</b> Effet des mutations dans la sous-unité $\sigma^{70}$	95
<b>Figure 28.</b> Effet des mutations dans la sous-unité $\sigma$ sur la synthèse de l'ARN abortif	96
<b>Figure 29.</b> Synthèse des run-off par différents sigma	98
<b>Figure 30.</b> Influence de la structure de l'ADN sur la sensibilité de l'ARNP à Lpm	102
<b>Figure 31.</b> Sensibilité du RPo de $E\sigma^{70}$ , $E\sigma^S$ , $E\sigma_{\Delta 3.2}$ à Lpm	105
<b>Figure 32.</b> Effets des variations de la structure de la sous-unité $\sigma$ sur la formation du RPo	108
<b>Figure 33.</b> Effet des mutations de la sous-unité $\sigma$ sur la formation du RPo	109
<b>Figure 34.</b> Dépendance à la température de l'ouverture du promoteur <i>lacUV5</i>	110
<b>Figure 35.</b> Formation du RPo sur le promoteur <i>lacUV5</i> par $E\sigma_{H518A}$ et $E\sigma^S$	111
<b>Figure 36.</b> Fluctuations des atomes C $\alpha$ des résidus 504 à 530 de la région 3.2	113
<b>Figure 37.</b> Interaction de la région 3.2 (vert) avec le résidu Q1256 du $\beta$ -SW3	113
<b>Figure 38.</b> Déviation spatiale au cours de la simulation des atomes C $\alpha$ de $\beta^1$ -SW2 et de la région 3.2	114
<b>Figure 39.</b> Changements de distance D(t) entre les atomes C $\alpha$ du résidu D514 dans la région 3.2	114
<b>Figure 40.</b> Fluctuations des atomes C $\alpha$ de $\beta^1$ -SW2 et de la région 3.2 du facteur sigma	115
<b>Figure 41.</b> Mécanisme de compétition au cours de l'inhibition par la Lpm	116
<b>Figure 42.</b> Docking de la Lpm dans la structure de l'ARNP d' <i>E.coli</i> avec le programme GOLD	118
<b>Figure 43.</b> Modélisations structurales des interactions entre $E\sigma^{70}$ , $E\sigma^S$ , Lpm	119
<b>Figure 44.</b> Modèle du mécanisme d'action de la lipiarmycine	137

## T

<b>Tableau 1.</b> Résistances naturelles des bactéries aux antibiotiques	19
<b>Tableau 2.</b> Facteur $\sigma^{70}$ chez <i>E. coli</i>	30

# ABBREVIATIONS

---

ADN	acide desoxyribonucleique
ARN	acide ribonucleique
ARNP	ARN polymerase
CMI	concentration minima inhibitrice
Da	Dalton
DM	dynamique moléculaire
dNTP	desoxynucleoside triphosphate
E	core enzyme
E $\sigma$	Holoenzyme
FDA	Food and Drug Administration
gp	glycoprotéine
HPLC	high performance liquid chromatography
HTS	high-throughput screening
IC <sub>50</sub>	Inhibitory concentration of 50% : concentration pour laquelle la croissance de 50% Des bactéries est inhibée
kDa	Kilo dalton
Ki	inhibition constant
Km	Michaelis constant
LpmR	résistant a la lipiarmycine
LpmS	sensible a la lipiarmycine
MRSA	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
N	n'importe lequel des nucleoside (A, G, C, T)
NMP	nucléoside monophosphate
Nt	nucléotide
NTP	nucléoside triphosphate
P	promoteur
Pb	paire de bases
PPi	pyrophosphate
ppGpp	guanosine tetrphosphate
pppGpp	guanosine pentaphosphate
R	ARN polymerase
Rif <sup>R</sup>	résistant a la rifampicine
RPc	complexe ferme
RPi	complexe intermediaire
RPo	complexe ouvert
Sor <sup>R</sup>	résistant a la sorangicine
TEC	transcription elongation

# **AVANT-PROPOS**

Ce document présente les travaux réalisés au cours de ma thèse que j'ai effectuée sous la direction de Mr Konstantin BRODOLIN au sein du Centre d'Etudes d'Agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CNRS–FRE3689) dirigé par Mr Jean-Michel MENARD dans l'équipe «**Enzymes bactériennes et résistances aux antibiotiques**».

Notre équipe développe trois axes de recherche.

- ❖ Transcription et résistance aux antibiotiques
- ❖ Enzymes bactériennes de résistance aux aminoglycosides
- ❖ Design rationnel d'inhibiteurs de 5'-nucléotidases

Ces thématiques s'inscrivent dans la recherche de nouveaux agents antibactériens destinés à répondre aux problèmes actuels liés à la montée croissante du phénomène de résistance bactérienne.

Notre équipe étudie le rôle des facteurs de transcription dans la génération des résistances aux antibiotiques qui ciblent l'ARNP procaryote, celle-ci étant l'enzyme centrale de la transcription chez les bactéries. Cette enzyme est la cible d'un grand nombre de protéines et de petites molécules de régulation dont certains antibiotiques. Parmi les molécules antibactériennes inhibant l'ARNP, la rifampicine (Rif) est l'antibiotique de première ligne pour le traitement de la tuberculose. Mais l'apparition de plus en plus fréquente de bactéries résistantes à cet antibiotique limite son utilisation. Les différents mécanismes conduisant à la résistance à la rifampicine sont développés dans la Publication n°1 suivante :

- Tupin A., Gualtieri M., Roquet-Baneres 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.

Le deuxième inhibiteur ciblant l'ARNP est la lipiarmycine (Lpm, également connue sous le nom de *tiacumicin B* ou sous le nom commercial de *fidaxomicin*). Depuis 2011, la Fidaxomicin est utilisée pour le traitement des infections liées à *clostridium difficile* et est commercialisée sous le nom de Difcid<sup>®</sup>. Elle inhibe l'étape précoce de l'initiation de la transcription en déstabilisant les interactions entre l'ARNP et la partie avale de l'ADN du promoteur. Cependant, le mécanisme précis de cette inhibition n'est pas encore bien défini. En raison de son utilisation clinique, les conséquences possibles pour l'apparition et la diffusion de nouvelles formes de résistances des bactéries pathogènes devraient être évaluées.

Tout d'abord, l'équipe a défini le site de fixation de la lipiarmycine à l'ARNP à partir de l'analyse des souches d'*Entérocooccus* résistantes à la lipiarmycine et dont les mutations sont localisées au niveau des sous-unités  $\beta$  et  $\beta'$  (Gualtieri et al., 2009). Le site de liaison identifié est

localisé en dehors de l'espace commun aux autres inhibiteurs de l'ARNP qui ne sont pas utilisés cliniquement.

La modélisation des mutations conférant des résistances à la lipiarmycine montre que l'une de ces mutations est localisée à proximité de  $\sigma^{70}$ . Aussi, il a été proposé que la délétion des acides aminés 513-519 dans la région 3.2 de  $\sigma^{70}$  ait conféré une résistance à Lpm (Tupin et al., 2010a) et  $\sigma^{70}$  pourrait contribuer à la formation du site de liaison de la lipiarmycine.

Dans le cadre de cette thèse, je me suis intéressée en particulier à la détermination des mécanismes précis par lesquels la sous-unité sigma est impliquée dans la formation du complexe d'initiation de la transcription et dans la résistance à la lipiarmycine.

La région 3.2 de sigma est variable, elle est fortement conservée chez les facteurs sigma du groupe I. Mais la séquence de cette région diffère significativement selon les sigmas alternatifs, tandis que le groupe IV a complètement perdu la région 3.2 qui a été remplacée par une séquence plus courte connectant les régions 2 et 4. La région 3.2 et l'élément  $\beta'$ -SW2 interviennent dans le positionnement du brin matrice dans le site actif au cours de la formation du complexe d'initiation de la transcription. .

Nous avons montré que la dynamique conformationnelle de la région 3.2 a une implication dans la stabilisation de la bulle de transcription au cours de l'initiation de la transcription et que les mutations dans deux régions de sigma, qui sont la région 1.2 localisée loin du site de liaison de Lpm et la région 3.2, induisent l'hypersensibilité à la Lpm. Cette découverte a montré que la sous-unité  $\sigma$  affecterait allostériquement l'activité de la Lpm et remettrait en question notre connaissance du mécanisme d'inhibition et le rôle de la région 3.2 dans la formation du complexe ouvert.

Nous avons constaté que le facteur  $\sigma^S$  (RpoS) qui contrôle la transcription des gènes impliqués dans la survie des bactéries en phase stationnaire et qui joue un rôle important dans la réponse au stress, peut conférer une hypersensibilité de l'ARNP à la Lpm.

L'hétérogénéité structurelle des ARNP au cours de la phase de croissance spécifique pourrait moduler la réponse bactérienne à l'antibiotique. Nous avons suggéré que la Lpm et les autres antibiotiques semblables pourraient être considérés comme une classe spéciale de régulateurs transcriptionnels et l'étude de leur rôle dans la régulation des gènes est un sujet d'avenir.

L'article suivant rapporte nos résultats concernant le mécanisme spécifique par lequel les régions 1.2 et 3.2 de la sous-unité  $\sigma$  pourraient être impliqués dans la génération des résistances en réponse au traitement antibiotique par la lipiarmycine.

- Morichaud, Z.; Chaloin, L.; Brodolin, K. Regions 1.2 and 3.2 of the RNA Polymerase  $\sigma$  Subunit Promote DNA Melting and Attenuate Action of the Antibiotic Lipiarmycin. *J Mol Biol.* 2016 Jan 29; 428(2 Pt B):463-76.

Le sujet présente un large intérêt pour la communauté scientifique parce qu'il traite de la partie non élucidée de l'initiation de la transcription et du mécanisme d'inhibition de la transcription.

Pour présenter l'ensemble de ces travaux de thèse, il m'a semblé nécessaire de rappeler en introduction, les notions permettant de préciser ce projet de recherche. Il se situe à la croisée de deux thématiques : les mécanismes transcriptionnels et la résistance aux antibiotiques.

Dans une première partie, je présenterai l'évolution actuelle de l'utilisation des antibiotiques amenant à l'apparition de bactéries résistantes et donc l'urgence d'en développer de nouveaux.

J'exposerai pourquoi l'ARN polymérase nous semble être une cible pertinente pour le développement de nouveaux antibiotiques. Ensuite, je décrirai la structure de cette enzyme, les différentes étapes du cycle transcriptionnel ainsi que les sites de liaison et les modes d'action des différents inhibiteurs de l'ARN polymérase connus. Afin d'éviter les traductions approximatives, j'ai choisi de conserver les dénominations en langue anglaise.

Dans une deuxième partie, je présenterai l'ensemble de mes résultats. La troisième partie sera consacrée à la discussion et des perspectives envisageables seront proposées.

# **CHAPITRE I : INTRODUCTION**

## **A. L'ARN polymérase cible potentielle de la recherche de nouveaux antibiotiques**

### **A.I) Généralités sur les antibiotiques**

Le terme «antibiotique» (ATB) a été introduit pour la première fois en 1889 par Paul Vuillemin ; mais sa définition actuelle a pour origine les travaux d'Alexander Flemming qui a découvert la pénicilline G. Les antibiotiques sont des molécules naturellement synthétisées par les microorganismes pour lutter contre les bactéries concurrentes présentes dans leur environnement (Waksman and Woodruff, 1942). Ils ont des modes d'action différents, mais la majorité d'entre eux inhibe les fonctions microbiennes essentielles comme la synthèse des protéines, la synthèse de l'ARN, la réplication de l'ADN et la synthèse de la paroi cellulaire. Ils ont des structures diverses et des origines différentes. Il existe aujourd'hui plusieurs familles d'antibiotiques composées de molécules soit naturelles, soit semi-synthétiques, soit synthétiques qui s'attaquent spécifiquement à une bactérie ou à un groupe de bactéries. Ils sont classés en cinq principaux groupes en fonction de leur cible.

Les bêta-lactamines qui comprennent les pénicillines, les carbapénèmes, les monobactames, les glycopeptides, les céphalosporines, les fosfomycines et le groupe des lipopeptides (polymyxines et lipopeptides cycliques) sont des inhibiteurs de la synthèse de l'enveloppe bactérienne.

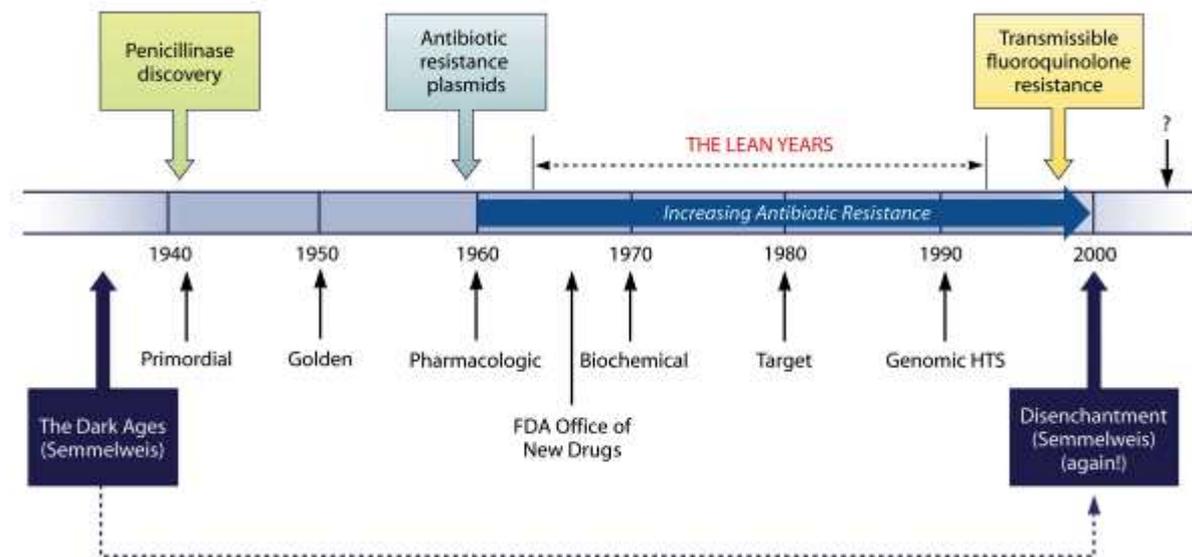
Le groupe contenant les aminosides, les macrolides, les phénicoles, les cyclines, les acides fusidiques et les oxazolidinones sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines.

Les sulfonamides sont des inhibiteurs de la synthèse des acides foliques.

Enfin, les quinolones, les quinoléines, la mupirocine et les rifamycines agissent sur la synthèse des acides nucléiques.

La découverte des antibiotiques a révolutionné l'histoire de la médecine. Pendant l'âge d'or, entre les années 1940 et les années 1960, presque toutes les classes d'antibiotiques actuellement connues ont été découvertes (**Figure 1**). La recherche antibiotique par l'industrie pharmaceutique a beaucoup diminué. Plusieurs raisons ont été avancées pour expliquer cette tendance (Beutler, 2009). La recherche et le développement de nouveaux médicaments sont un long processus de plus en plus coûteux. Lorsque les nouvelles molécules atteignent finalement le marché, il est difficile de rentabiliser le coût investi (Li and Vederas, 2009). En outre, la recherche a tendance à s'orienter vers les molécules de synthèse et le développement de grandes bibliothèques par le criblage automatisé à haut débit (HTS), afin de réduire le temps et les dépenses nécessaires à la découverte de produits naturels.

Pendant les deux dernières décennies, les avancées technologiques, particulièrement dans le domaine de la biologie moléculaire, de la génomique, de la chimie combinatoire et de HTS ont fourni des outils particulièrement efficaces pour accélérer la découverte de nouveaux antibiotiques (**Figure 1**).



**Figure 1.** Historique de la découverte des antibiotiques et du développement concomitant des résistances (Davies and Davies, 2010).

En dépit de l'identification de nouvelles cibles et de la création de bibliothèques chimiques, peu de succès ont été obtenus dans la recherche de nouvelles molécules anti-infectieuses approuvés pour l'utilisation humaine. Cet échec reflète les défis particuliers de cette recherche ( Drug Discovery and Development, 2011). Cela s'explique également par le

fait qu'un antibiotique doit agir sur de multiples cibles de différentes espèces qui peuvent devenir résistantes. Il doit traverser la membrane cellulaire et la membrane microbienne pour accéder à sa cible intracellulaire en restant actif. Il doit également malgré les fuites et les mécanismes de résistance être maintenu à une concentration intracellulaire efficace.

## **A.II) Emergence de bactéries résistantes**

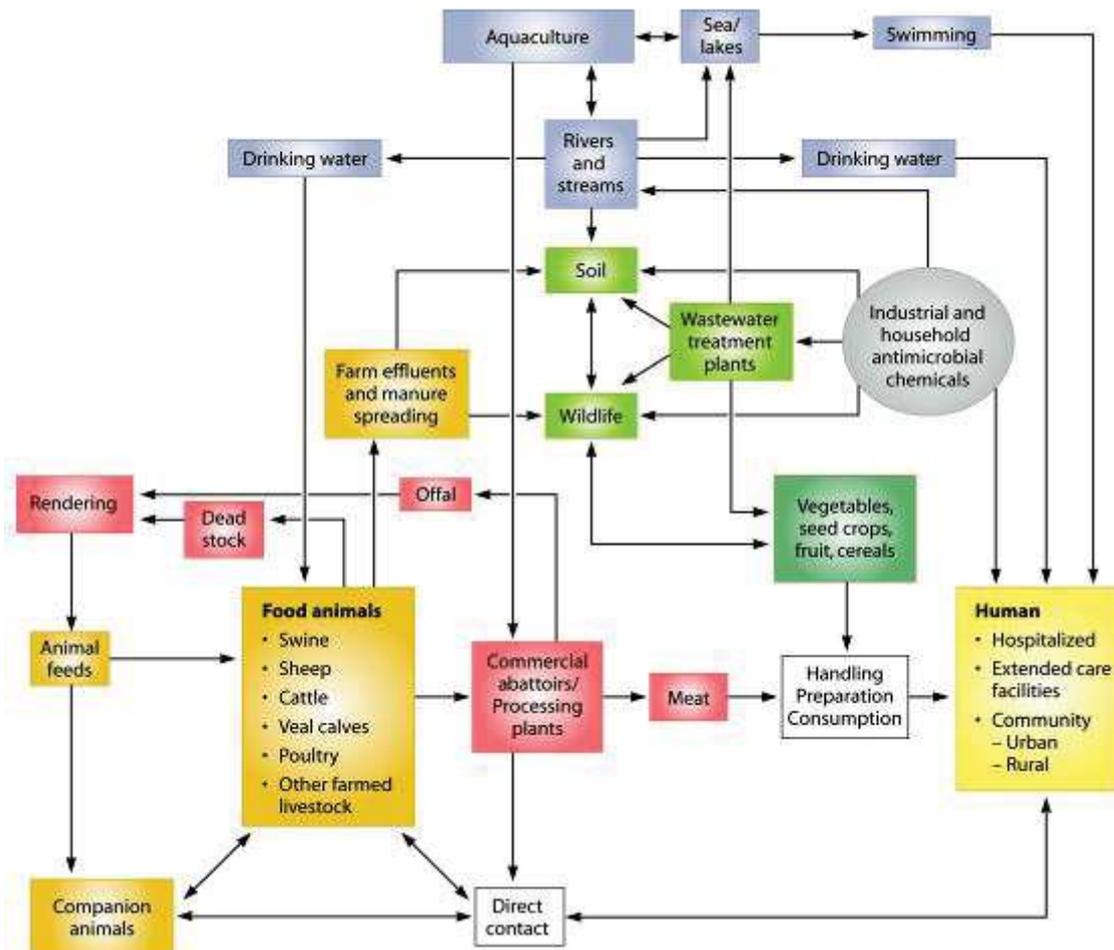
Largement utilisés ces dernières décennies, les antibiotiques ont permis de faire considérablement reculer la mortalité associée aux maladies infectieuses et ont contribué à la préservation de la santé. Mais l'efficacité remarquable des antibiotiques s'est accompagnée d'une utilisation abusive. Selon une étude du Centre Américain de Contrôle et de Prévention des Maladies (CDC), leur usage et leur dosage sont inadaptés dans 50% des cas (Davies and Davies, 2010). Les antibiotiques sont aussi très utilisés dans le domaine vétérinaire. Dans l'industrie alimentaire du bétail, ils sont également utilisés comme hormone de croissance. Dans l'élevage et l'aquaculture, ils sont utilisés à forte dose à titre prophylactique ; on estime à plusieurs millions de tonnes les antibiotiques libérés dans la biosphère ces cinquante dernières années (Davies and Davies, 2010).

Cet abus a généré une pression sur les bactéries qui ont développé des systèmes de défense contre ces antibiotiques. Cette pression de sélection a induit l'apparition de résistances. Ponctuelles au départ, ces résistances sont devenues fréquentes et préoccupantes. Certaines souches sont devenues multirésistantes, c'est-à-dire résistantes à plusieurs antibiotiques. Certaines sont même devenues résistantes à tous les antibiotiques disponibles sur le marché. Ce phénomène encore rare est en augmentation et conduit vers une impasse thérapeutique. Les bactéries multi-résistantes issues des élevages peuvent se transmettre à l'homme directement ou via la chaîne alimentaire.

Les bactéries multirésistantes de plus en plus nombreuses constituent un problème majeur en raison de la gravité des infections dont elles sont responsables et en raison de leur capacité à se diffuser (**Figure 2**). Elles font l'objet d'un programme de surveillance et de prévention depuis le milieu des années 1990.

On estime le nombre de maladies et de décès dus aux résistances aux antibiotiques des bactéries et des champignons aux Etats-Unis en 2013 à au moins 2.049.442 pathologies et à 23000 décès.

L'estimation du nombre de pathologies et de morts dus aux résistances à *Clostridium difficile* (*C. difficile*): est de 250.000 maladies et de 14.000 morts (ar-threats-2013-508.)



**Figure 2.** Dissémination des antibiotiques dans l'environnement : agriculture, communautés urbaines et rurales, hôpitaux, eaux usées (Davies and Davies, 2010)

### A.III) Transmissions des résistances aux antibiotiques

La plupart des bactéries ont plusieurs mécanismes de résistance pour chaque antibiotique. Lorsqu'une résistance est acquise, elle se propage par division cellulaire (transfert vertical) et par transfert d'ADN d'une bactérie à l'autre (transfert horizontal) (Livermore, Clin. Infect. Dis., 2003).

#### A.III.1 Résistances naturelles

Certaines bactéries sont naturellement résistantes à quelques antibiotiques (**Tableau 1**). C'est un phénomène lié à l'apparition des premiers antimicrobiens naturellement produits par les bactéries et les champignons. En effet, le rôle premier des antibiotiques est d'inhiber la croissance d'espèces concurrentes dans la même niche écologique. Ces bactéries ont développé parallèlement des stratégies pour se protéger des effets délétères des antimicrobiens (Waksman and Woodruff, 1940). Ce phénomène est défini comme une résistance intrinsèque ou naturelle ;

on parle de résistance innée. Leur patrimoine génétique les rend insensibles à un certain nombre d'antibiotiques.

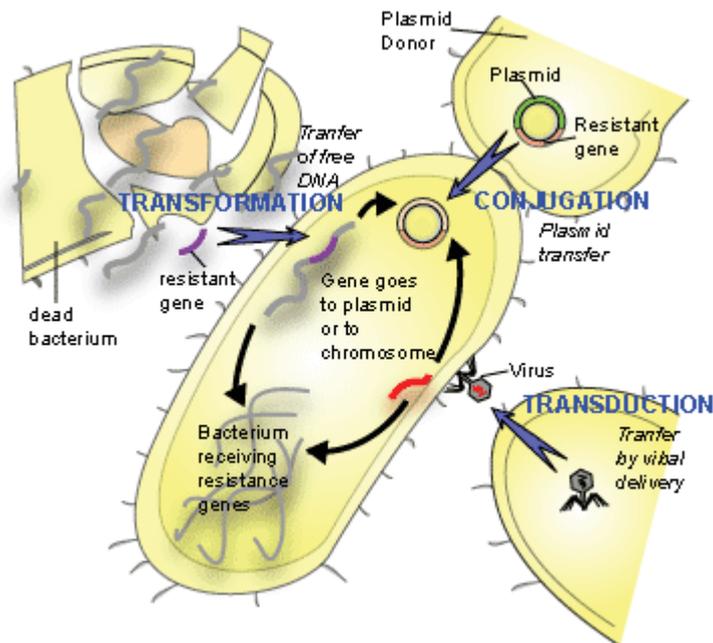
ORGANISMS	NATURAL RESISTANCE AGAINST:	MECHANISM
Anaerobic bacteria	Aminoglycosides	Lack of oxidative metabolism to drive uptake of aminoglycosides
Aerobic bacteria	Metronidazole	Inability to anaerobically reduce drug to its active form
Gram-positive bacteria	Aztreonam (a beta-lactam)	Lack of penicillin binding proteins (PBPs) that bind and are inhibited by this beta lactam antibiotic
Gram-negative bacteria	Vancomycin	Lack of uptake resulting from inability of vancomycin to penetrate outer membrane
<i>Klebsiella</i> spp.	Ampicillin (a beta-lactam)	Production of enzymes (beta-lactamases) that destroy ampicillin before the drug can reach the PBP targets
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Imipenem (a beta-lactam)	Production of enzymes (beta lactamases) that destroy imipenem before the drug can reach the PBP targets.
Lactobacilli and <i>Leuconostoc</i>	Vancomycin	Lack of appropriate cell wall precursor target to allow vancomycin to bind and inhibit cell wall synthesis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sulfonamides, trimethoprim, tetracycline, or chloramphenicol	Lack of uptake resulting from inability of antibiotics to achieve effective intracellular concentrations
Enterococci	Aminoglycosides	Lack of sufficient oxidative metabolism to drive uptake of aminoglycosides
	All cephalosporins	Lack of PBPs that effectively bind and are inhibited by these beta lactam antibiotics

**Tableau 1.** Résistances naturelles des bactéries aux antibiotiques (Forbes et al., 1998; Giguère, 2013)

### A.III.2 Résistances acquises

Le phénomène de la résistance acquise peut survenir à la suite d'une mutation génétique affectant le chromosome de la bactérie, permettant à cette dernière de contourner l'effet délétère de l'antibiotique auquel elle était sensible auparavant.

Il peut aussi être lié à l'acquisition de matériel génétique porteur d'un ou de plusieurs gènes de résistance en provenance d'une autre bactérie phylogénétiquement proche ou être liées à l'acquisition soit d'un plasmide, soit d'éléments transposables. Ce transfert peut parfois s'opérer entre des bactéries très éloignées sur le plan phylogénétique (**Figure 3**). Les résistances chromosomiques ne concernent en général qu'un antibiotique ou une famille d'antibiotiques. Les résistances plasmidiques peuvent concerner plusieurs antibiotiques, voire plusieurs familles d'antibiotiques. Elles représentent le mécanisme de résistance le plus répandu, soit 80 % des résistances acquises.



**Figure 3.** Les trois mécanismes de transfert génétique horizontal (HGT) chez les bactéries.

La transformation implique l'assimilation de fragments d'ADN courts, libres par des bactéries naturellement transformables. La transduction se produit quand l'ADN est transféré d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire de bactériophages. La conjugaison est le processus de transfert du matériel génétique entre deux cellules bactériennes dans le contact proche via pilus sexuel (Bacterial Resistance to Antibiotics)

#### **A.IV) Mécanismes des résistances aux antibiotiques**

La résistance aux antibiotiques peut s'exprimer à travers plusieurs mécanismes différents (**Figure 4**).

##### **A.IV.1 Altération de l'antibiotique**

Les bactéries produisent des enzymes qui altèrent chimiquement les antibiotiques et les rendent ainsi inactifs : c'est le cas des  $\beta$ -lactamases qui hydrolysent l'anneau  $\beta$ -lactame des pénicillines et des céphalosporines. C'est le mécanisme le plus répandu qui entraîne l'apparition des résistances à la pénicilline (Jacoby, 1994) . D'autres enzymes inactivent les antibiotiques en leur ajoutant des groupements chimiques : par exemple les aminosides peuvent être inactivés par phosphorylation, adénylylation ou acétylation (Shaw et al., 1993).

#### A.IV.2 Modification de la cible

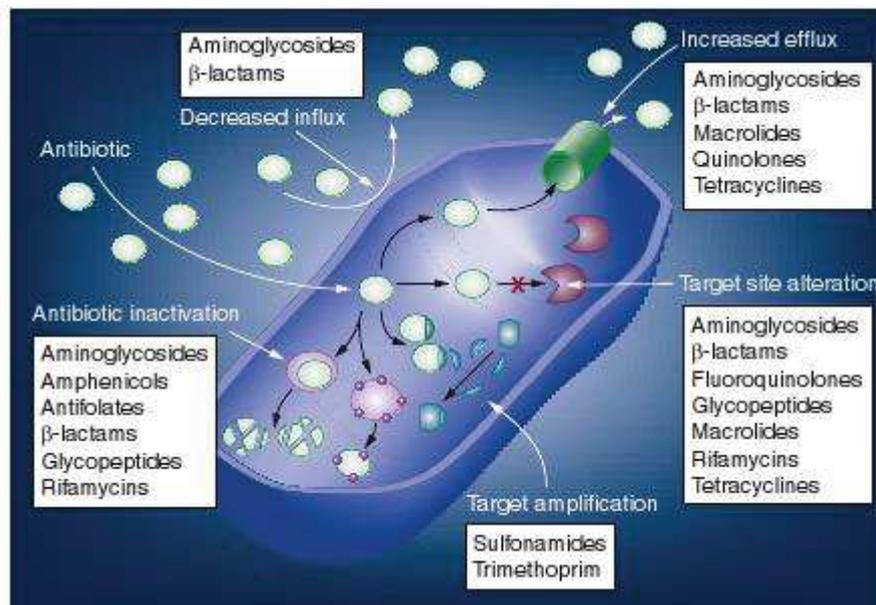
Des bactéries peuvent produire des protéines ou des enzymes qui ne sont plus sensibles aux antibiotiques, mais qui ont les mêmes fonctions que les protéines cibles. Nous citerons la résistance à la rifampicine chez *Mycobacterium tuberculosis* due à des mutations de l'ARN polymérase dans la région  $\beta$  du gène *rpoB*, qui sont sans conséquences fortes sur le déroulement de la transcription.

#### A.IV.3 Réduction de la perméabilité

L'imperméabilisation de la membrane de la bactérie limite la pénétration de l'antibiotique. Ce mécanisme est utilisé par les bactéries pour empêcher l'antibiotique de pénétrer dans la cellule : par exemple la perte ou la modification de la porine chez *Pseudomonas aeruginosa* confère une résistance accrue aux carbapénèmes (Köhler et al., 1999).

#### A.IV.4 Mécanisme d'expulsion des antibiotiques

Les bactéries produisent souvent des protéines membranaires agissant comme pompes moléculaires permettant d'expulser un antibiotique à l'extérieur de la cellule. C'est le mécanisme principal de la résistance à la tétracycline, chez les bactéries Gram positif et Gram négatif (Nikaido, 1994).



**Figure 4.** Les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Schmieder and Edwards, 2012)

## A.V) Recherche de nouvelle voies

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique car elle est en constante augmentation dans les pathologies humaines du fait de l'acquisition d'au moins une résistance à une classe d'antibiotiques utilisée cliniquement. Si aucune solution nouvelle n'est apportée, on estime qu'en 2050 dix millions de personnes mourront d'une infection causée par un microbe résistant. Le coût rapporté à ces infections approchera les cent milliards d'euros (AMR Review Paper - Tackling a crisis for the health and wealth of nations).

Conséquences directes de ce phénomène, les infections nosocomiales touchent un patient hospitalisé sur vingt en France. Quant à certaines maladies, comme la tuberculose elles enregistrent de plus en plus de cas de multi-résistance : 450 000 nouveaux cas ont été ainsi recensés en 2014 à travers le monde. Ce type d'infection est extrêmement difficile à combattre et il est essentiel de découvrir rapidement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Un certain nombre d'erreurs stratégiques a sans aucun doute contribué au désengagement des grands laboratoires pharmaceutiques. Les incitations publiques à une moindre consommation ont découragé les laboratoires pharmaceutiques d'investir dans cette voie de recherche. C'est pourquoi l'Innovative Medicines Initiative (programme européen) a lancé en mai 2013 l'opération « **New Drugs 4 Bad Bugs** ». C'est un partenariat entre les industriels, le monde universitaire et les laboratoires de recherches biotechnologiques pour accélérer la recherche en Europe et développer de nouveaux antibiotiques contre les bactéries résistantes prioritaires.

D'autres voies de recherche se mettent en place progressivement dans ce domaine.

Les chercheurs tentent d'inhiber l'action des enzymes bêta-lactamases produites par certaines bactéries et qui les rendent résistantes aux antibiotiques de la famille des bêta-lactamines.

D'autres équipes tentent de développer des thérapies « antivirulence ». L'objectif est de bloquer les systèmes qui rendent les bactéries pathogènes pour l'homme.

La phagothérapie fait l'objet d'un regain d'intérêt (Dufour et al., 2015). Elle était tombée dans l'oubli en cédant la place aux antibiotiques. La situation s'inversera peut-être dans l'avenir car elle pourrait être une solution pour traiter les infections résistantes aux antibiotiques.

Elle consiste à faire éliminer les bactéries par des phages. Ce sont des virus qui infectent spécifiquement certaines bactéries, s'y reproduisent, puis les détruisent en libérant de nouveaux phages. Cette spécificité permet d'éliminer les bactéries pathogènes sans affecter les autres, contrairement aux antibiotiques à large spectre. Le développement de cocktails de phages utilisés pour le traitement des infections cutanées provoquées par les bactéries *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* à la suite de brûlures ou de blessures est actuellement en cours

d'expérimentation (Phagoburn: Evaluation of phage therapy for the treatment of burn wound infections).

## **A.VI) L'ARN polymérase est une cible des antibiotiques**

L'ARN polymérase ADN dépendante (ARNP) est l'enzyme responsable de la transcription. Cette première étape est souvent l'étape décisive dans l'expression des gènes. Deux inhibiteurs de l'ARNP seulement sont actuellement commercialisés. Ce sont la rifampicine et ses dérivés qui sont les plus largement utilisés (Calvori et al., 1965) pour le traitement de la tuberculose ainsi que pour d'autres infections, et la lipiarmycine (Lpm) qui a été approuvée en utilisation clinique en 2011 pour le traitement de *Clostridium difficile* (Scott, 2013).

Plusieurs séries de différents composés isolés à partir de ressources naturelles (O'Neill et al., 2000; Sonenshein and Alexander, 1979) ou provenant de bibliothèques chimiques (Artsimovitch et al., 2003) agissent sur l'ARNP. La plupart d'entre eux possèdent des sites de liaison très proches et présentent parfois des résistances croisées. Cependant, aucun de ces composés n'est à l'heure actuelle parvenu à l'étape de l'utilisation clinique.

D'autres arguments indiquent que l'ARNP est une cible potentielle pour le développement de nouveaux antibiotiques :

- ❖ A la différence des eucaryotes, les procaryotes ont une seule ARNP qui contrôle la transcription de tous les gènes de la cellule. Les ARNPs sont des enzymes formées de plusieurs sous-unités. Chez les procaryotes, ces enzymes sont constituées de séquences très conservées. Par conséquent, un seul antibiotique pourrait donc être actif contre plusieurs espèces bactériennes. Cependant, son utilisation à grande échelle favoriserait l'apparition et la dissémination de résistances.
- ❖ La structure globale des ARNPs des procaryotes et des eucaryotes présente une forte homologie mais leurs séquences sont différentes. Aussi, les inhibiteurs actifs sur l'ARNP des bactéries ne seront pas actifs sur l'ARNP des eucaryotes. Il est donc possible d'administrer ces antibiotiques aux patients sans risque d'interactions avec leurs propres enzymes.
- ❖ De nombreuses structures de haute résolution de l'ARNP et des complexes de transcriptions sont disponibles. Ces éléments pourraient permettre la conception de molécules pouvant avoir une forte interaction afin d'augmenter leur affinité et leur efficacité.

La disponibilité de la structure de complexes d'ARNP et d'inhibiteurs de transcription pourrait être utilisée pour développer des composés bipartites à potentiel antibactérien à large spectre et susceptibles d'agir contre les bactéries résistantes.

- ❖ l'ARNP bactérien est un complexe de taille importante de 400 kDa ; il possède de nombreuses poches potentielles à sa surface. Il serait donc possible dans les années futures de découvrir de nouvelles molécules ciblant certaines de ces poches.
- ❖ Des relations étroites existent entre la réplication, la transcription, la traduction. En ciblant la transcription, un inhibiteur pourrait perturber l'ensemble des fonctions de contrôle des gènes bactériens au cours des différentes phases de croissance ou lors de situation de stress.
- ❖ Chez *E coli*, la sous-unité sigma70 est responsable de la transcription de la majorité des promoteurs au cours de la phase de croissance exponentielle, tandis qu'un ensemble de facteurs sigma alternatifs contrôlent l'expression de l'ensemble des gènes spécialisés dans les situations de stress, en condition de carence en nutriments ou d'infection. La sous-unité sigma pourrait être impliquée dans l'apparition de la résistance aux antibiotiques. En ciblant l'interaction  $\sigma$ -core, il serait possible de mettre sur le marché des antibiotiques ciblant certaines activités spécifiques des bactéries ou des antibiotiques actifs sur les bactéries persistantes et sur les biofilms (Andre, 2006).

Cependant, les bactéries développent de nombreuses résistances à la rifampicine et à ses dérivés à une fréquence élevée. Ce phénomène limite fortement leur utilisation et la découverte de nouveaux inhibiteurs présente un grand intérêt pour la communauté biomédicale. Outre leur intérêt thérapeutique, ces inhibiteurs sont aussi des outils importants pour caractériser l'activité de leur cible. Le nombre de molécules utilisées cliniquement ciblant l'ARNP est faible si on le compare à celui des molécules dirigées vers d'autres cibles. Néanmoins, l'ARNP reste une cible particulièrement intéressante pour des antibiotiques potentiels.

## B. L'ARN polymérase

L'ARN polymérase ADN dépendante (ARNP) est l'enzyme centrale d'expression des gènes. Toutes les formes de vie possèdent de l'ARNP qui est un complexe protéique formé de plusieurs sous-unités responsable du processus de la transcription qui aboutit à la synthèse de l'ARN à partir d'une matrice ADN. Les procaryotes possèdent un seul type d'ARNP responsable de la synthèse de tous les ARNs de la cellule (ARN messagers, ARN ribosomaux et ARN de transfert), contrairement aux eucaryotes qui nécessitent trois types d'ARNPs pour la synthèse des différents types d'ARNs. La conservation de la structure et de la fonction des différentes polymérases font de l'ARNP bactérienne un excellent modèle pour étudier les mécanismes fondamentaux de la transcription.

L'ARNP bactérienne existe sous deux formes : le core et l'holoenzyme. L'obtention de la structure de L'ARNP par cristallographie étant difficile, la structure tridimensionnelle de l'holoenzyme d'*E.coli* a d'abord été déterminée en utilisant la microscopie électronique (Darst et al., 1989). La première structure cristallographique du core de l'ARNP de *Thermus aquaticus* a été déterminée en 1999 et 2002 (Murakami et al., 2002; Zhang et al., 1999); celle de l'ARNP de *Thermus thermophilus* a été résolue en 2002 (Vassylyev, Nature, 2002) et celle de l'holoenzyme d'*E.coli* en 2013 (Murakami, 2013).

### B.I) Core de l'ARN polymérase (E)

L'ARNP bactérienne est la forme la plus simple; son core est composé de cinq sous-unités ( $\alpha\beta\beta'\omega$ ) (**Figure 5**) qui forment une protéine d'environ 400 kDa. Chez les eucaryotes et les archaea, l'ARNP possède des polypeptides supplémentaires qui forment des complexes de 11 à 15 sous-unités (Murakami, 2013).

La cristallographie a révélé que la structure de l'ARNP bactérienne ressemble à une « pince de crabe », avec deux mâchoires. La plus grande sous-unité  $\beta'$  (1407 acides aminés soit 155 kDa) forme une pince que l'on nomme "  $\beta'$  jaw/clamp". La deuxième sous-unité  $\beta$  (1342 acides aminés soit 150 kDa) forme l'autre pince que l'on nomme "  $\beta$  lobe". Les deux pinces délimitent le canal principal contenant le site actif qui est un déterminant nécessaire à la transcription. Ce canal qui a une largeur de 27 Å, sert de site de liaison à l'ADN et conduit jusqu'à l'ion catalytique  $Mg^{2+}$  (Young et al., 2002; Zhang et al., 1999). A ce canal principal s'ajoutent le canal secondaire et le canal de sortie de l'ARN. Le canal secondaire relie

l'extérieur de l'ARNP au site actif. Il est supposé amener les nucléotides jusqu'au site catalytique et permettrait également la sortie des courts fragments abortifs (Cramer et al., 2000; Severinov, 2000).

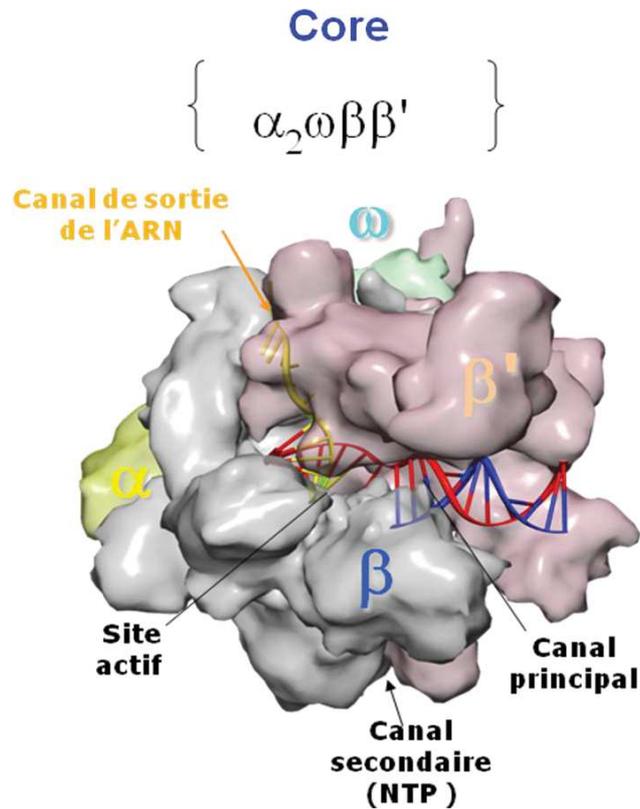
Les sous-unités  $\beta$  et  $\beta'$  forment des domaines mobiles  $\beta$  lobe,  $\beta$  flap,  $\beta'$  jaw and  $\beta'$  clamp qui entourent le site actif (Ghosh et al., 2010). Ces domaines mobiles favorisent la liaison avec le facteur sigma et l'ADN du promoteur. Le domaine clamp est relié à d'autres domaines de l'ARNP par cinq éléments switch :  $\beta'$  switch 1,2 et 5 et  $\beta$  switch 3 et 4 (Murakami, 2013). Ces éléments mobiles jouent un rôle de charnière permettant l'ouverture et la fermeture du clamp.

L'entrée de l'ADN dans le canal principal est régulée par l'ouverture et la fermeture des domaines  $\beta'$  clamp et  $\beta'$  jaw au cours du cycle de la transcription. Lors de l'initiation de la transcription,  $\beta'$  clamp est ouvert afin que l'ADN double brin puisse entrer dans le site actif, mais lors de l'élongation,  $\beta'$  clamp se ferme. Cela contribue à la processivité de la transcription (Murakami and Darst, 2003).

Les deux sous-unités  $\alpha$  forment un dimère et sont placées à l'interface de  $\beta$  et  $\beta'$ . Elles sont composées de deux domaines : le domaine N-terminal ( $\alpha$ NTD  $\sim$ 26 kDa) et le domaine C-terminal ( $\alpha$ -CTD  $\sim$ 9 kDa).  $\alpha$ NTD a un rôle dans l'assemblage des deux sous-unités  $\beta$  et  $\beta'$  (Hayward et al., 1991) et  $\alpha$ -CTD interagit avec divers activateurs transcriptionnels. Ce dernier reconnaît la séquence spécifique de l'élément UP et les séquences non spécifiques de l'ADN du promoteur (Gourse et al., 2000; Haugen et al., 2008).

La sous-unité  $\omega$  (91 acides aminés soit 10 kDa) n'a aucun rôle actif dans la transcription, mais semble fonctionner comme une chaperonne dans l'assemblage de l'ARNP (Zhang et al., 1999). Elle interagit largement avec la partie C-terminal de  $\beta'$  et cette sous-unité peut avoir une fonction dans les étapes de l'assemblage du core de l'ARNP.

Le core a une taille d'environ 150 Å de longueur, 115 Å de largeur et 110 Å de profondeur (Zhang et al., 1999). Sa surface est globalement chargée négativement alors que le canal principal est chargé positivement. L'ARNP procaryote possède deux domaines de liaison avec le zinc. Le premier Zn I est situé au niveau de la surface supérieure de la sous-unité  $\beta'$  ZBD, alors que le deuxième Zn II est localisé à l'extérieur du canal primaire. Zn II pourrait jouer un rôle dans le repliement de la sous-unité  $\beta'$  (Markov et al., 1999; Vassylyev et al., 2002; Zhang et al., 1999).



**Figure 5.** Structure globale du core de l'ARNP de *T. thermophilus* avec l'ADN (rouge et bleu)

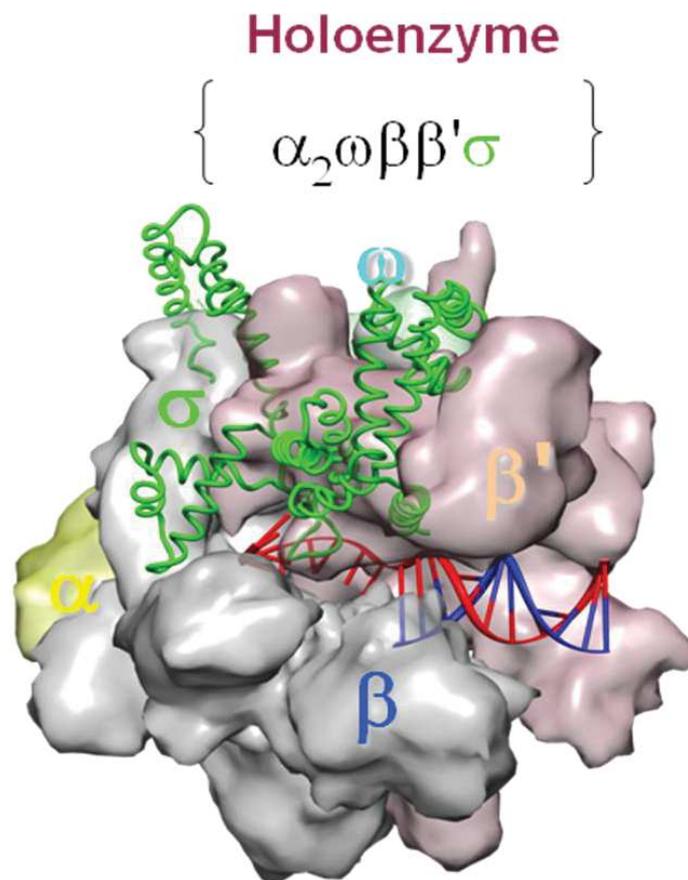
## B.II) L'holoenzyme ( $E\sigma$ )

Le core de l'ARNP est catalytiquement actif, mais incapable d'initier la transcription. Il nécessite la liaison d'une sous-unité supplémentaire (le facteur  $\sigma$ ) pour former l'holoenzyme (**Figure 6**). Les interactions entre  $\sigma$  et le core entraînent de profonds changements conformationnels au niveau du core et au niveau du facteur sigma. Les balancements des domaines mobiles du core de l'ARNP réduisent la largeur du canal principal de 10 Å. Le domaine  $\beta'$  coiled-coil, une partie du domaine  $\beta$  N-terminal et le canal de sortie de l'ARNP changent de position dans l'holoenzyme (Murakami et al., 2002; Vassylyev et al., 2002).

Le facteur sigma est formé de quatre domaines connectés par des bras flexibles qui interagissent avec le core. Ils sont répartis sur une seule face de l'ARNP et l'interface entre le core et le facteur sigma est supérieure à 8000 Å<sup>2</sup> (Murakami et al., 2002; Vassylyev et al., 2002). La région 1.1 occupe le canal d'entrée de l'ADN et la région 2 est en contact avec le domaine  $\beta'$  coiled-coil. Ce contact représente la plus importante interaction entre sigma et le core. Ce domaine induit des changements de conformation du facteur sigma qui vont permettre la liaison avec l'ADN et la reconnaissance de l'élément -10 par la région 2.3 (Young et al.,

2004, 2001). Le domaine 3 repose sur une partie du site actif et interagit principalement avec la sous-unité  $\beta$ . La région 3.2 en forme de boucle relie les domaines  $\sigma_3$  et  $\sigma_4$ . Elle est enfouie en partie dans le canal principal et bloque le canal de sortie de l'ARN. Le domaine 4 forme une poche hydrophobe où se loge la pointe de l'élément  $\beta$  flap. Cette interaction implique le déplacement de  $\sim 11\text{\AA}$  de l'hélice située au bout du  $\beta$  flap et permet probablement aux régions 2 et 4 de reconnaître simultanément les éléments -10 et -35 du promoteur (Vassylyev et al., 2002). Cette affinité de sigma au core de l'ARNP stabilise l' holoenzyme (Murakami and Darst, 2003) .

Au cours de la transcription, l'holoenzyme qui reconnaît spécifiquement les éléments -10 et -35 de l'ADN du promoteur forme un complexe fermé (RPc). Celui-ci va subir divers changements conformationnels et former un complexe ouvert (RPo) stable et compétent pour amorcer la synthèse de l'ARN. Le facteur sigma se dissocie du core de l'ARNP qui lie les facteurs régulateurs au cours de l'élongation et au cours de la terminaison de la transcription (Figure 12).



**Figure 6.** Structure de l'holoenzyme de *T. thermophilus* avec le facteur sigma en vert.

### **B.II.1 Facteurs de transcription sigma ( $\sigma$ )**

L'initiation de la transcription est le point crucial de l'expression des gènes chez les procaryotes. Les acteurs-clés dans ce processus, sont les facteurs sigma ( $\sigma$ ), ils s'associent avec le core catalytique de l'ARN polymérase pour le guider à travers les étapes essentielles de l'initiation : reconnaissance des promoteurs, fusion de l'ADN et synthèse des premiers nucléotides de la transcription. La découverte du facteur sigma, il y a 45 ans, a permis à la recherche d'entrer dans une nouvelle ère de la biologie régulatrice afin de comprendre comment la cellule assure la fidélité de l'initiation de la transcription. Cela a permis de supposer que tous les ARNPs exigent des fonctions d'initiation distinctes. Cette division des tâches n'est pas surprenante. Pour effectuer la transcription, l'ARNP doit efficacement traverser une grande fraction du génome sans préférence pour la séquence d'ADN pendant la phase d'élongation. Néanmoins, le début de la transcription doit partir d'une séquence précisément spécifiée et régulée. Les cellules ont résolu ce problème par l'encodage des sites de début de transcription par des séquences d'ADN spécifiques : les promoteurs (**Figure 11**) et l'ARNP localise ces séquences par l'intermédiaire des facteurs sigma qui fonctionne principalement lors de l'initiation. (Feklístov et al., 2014a; Mauri and Klumpp, 2014).

Les différents programmes de transcription sont modulés par la disponibilité des facteurs sigma en fonction de la régulation de leur transcription et de leur traduction et également en fonction de la régulation de leur protéolyse ainsi que leur séquestration par des anti-sigma (Ishihama, 2000; Sharma and Chatterji, 2010).

Les bactéries ont un seul et essentiel facteur  $\sigma$  qui assure la transcription de milliers de gènes ( $\sigma^{70}$  chez *E. coli*,  $\sigma^A$  chez *B. subtilis*) au cours de la phase de croissance, tandis que les autres facteurs sigma agissent comme des régulateurs en réponse à un signal. Les différents sigma rivalisent pour s'associer avec le core de l'ARNP. Le nombre total de core dans une cellule en croissance d'*E. coli* est de 2000 molécules soit la moitié du nombre total de gènes (4000 gènes) dans le génome d'*E. coli* (Blattner et al., 1997).

### **B.II.2 Les facteurs sigma peuvent être classés en deux familles :**

La famille  $\sigma^{70}$  en référence au principal facteur  $\sigma^{70}$  chez *E. coli*, partage des ressemblances structurelles. Mais malgré cette similitude globale, la famille  $\sigma^{70}$  reconnaît des classes différentes de promoteurs (Gruber and Gross, 2003).

La famille des  $\sigma^{54}$ , qui diffère structurellement de la famille  $\sigma^{70}$  nécessite la présence d'un activateur protéique et de l'ATP pour la formation du complexe ouvert (Buck et al., 2000). Elle est responsable de l'expression des gènes impliqués dans la fixation de l'azote ou dans la

réponse à un stress. Elle représente 60% du génome bactérien (Buck et al., 2000).  $\sigma^{54}$  reconnaît des éléments du promoteur en positions -12 et -24 (Wigneshweraraj et al., 2008).

Chez les bactéries à Gram-négatif comme *E. coli*, les gènes codant pour les facteurs  $\sigma$  sont désignés *rpo*. Chez les bactéries à Gram-positif, les gènes sont désignés par *sig*.

La plupart des eubactéries possèdent plusieurs membres de la famille des  $\sigma^{70}$ , mais habituellement un seul représentant de la famille  $\sigma^{54}$  (Gruber and Gross, 2003). Le nombre de facteurs sigma est très variable, soit 65 chez *Streptomyces coelicolor*, 19 chez *B. subtilis*, 7 chez *E. coli*, un seul sigma chez les *Mycoplasmes*. Ils sont désignés par des nombres ou par des lettres,  $\sigma^{70}$  ( $\sigma^D$ ),  $\sigma^{54}$  ( $\sigma^N$ ),  $\sigma^{38}$  ( $\sigma^S$ ),  $\sigma^{32}$  ( $\sigma^H$ ),  $\sigma^{28}$  ( $\sigma^F$ ),  $\sigma^{24}$  ( $\sigma^E$ ) et  $\sigma^{18}$  ( $\sigma^{FecI}$ ).

Le facteur sigma primaire est  $\sigma^{70}$  (également appelé  $\sigma^D$ ), en raison de sa masse moléculaire d'environ 70.000 Da. Dans beaucoup d'autres bactéries, l'analogue du facteur sigma primaire est désigné  $\sigma^A$ .

Tableau 2. Facteur  $\sigma^{70}$  chez *E. coli* avec les poids moléculaires des protéines (Cook and Ussery, 2013)

Gene	Aliases	Function	Wt. (kDa)
<i>rpoD</i>	$\sigma^{70}$	Household sigma factor	70 ± 0.06
<i>rpoS</i>	$\sigma^{38}$ , $\sigma^S$	Stationary phase	38 ± 1.2
<i>rpoH</i>	$\sigma^{32}$ , $\sigma^H$	Heat shock (cytoplasm)	32 ± 0.02
<i>rpoE</i>	$\sigma^{24}$ , $\sigma^E$	Heat shock (periplasm)	22 <sup>a</sup>
<i>rpoN</i>	$\sigma^{54}$ , $\sigma^N$	Nitrogen regulation	54 ± 0.2
<i>fliA</i>	$\sigma^{28}$ , $\sigma^F$	Flagella biosynthesis	28 ± 0.3
<i>fecI</i>	$\sigma^{19}$	Ferric citrate transport	19 <sup>a</sup>

Les facteurs sigma appartenant à la famille  $\sigma^{70}$  peuvent être divisés en quatre groupes liés phylogénétiquement et selon leur fonction (Lonetto et al., 1992) (Figure 7).

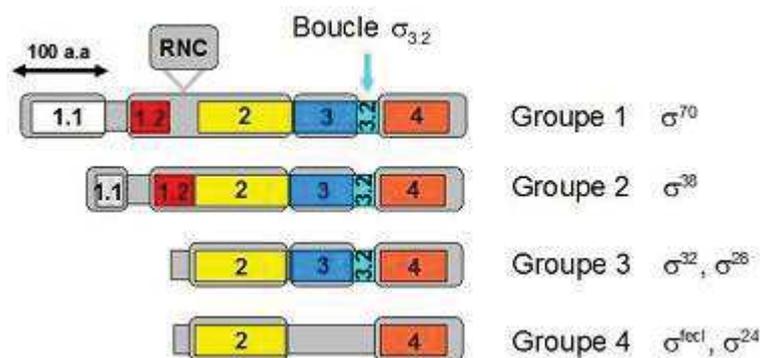


Figure 7. Représentation schématique de la structure des différents groupes de facteurs  $\sigma$ .

- **Groupe 1**

Il rassemble les facteurs sigma primaires ayant une haute homologie de séquences avec le  $\sigma^{70}$  d'*E. coli*. Ils sont essentiels à la survie de la bactérie et assurent la transcription des gènes de ménage pendant la phase de croissance exponentielle. La plupart des bactéries ont un seul facteur sigma primaire.

- **Groupe 2**

Il rassemble les sigmas alternatifs qui sont semblables à ceux de groupe 1, bien que la plupart d'entre eux ait perdu la région 1.1. Ils ne sont pas essentiels à la croissance bactérienne et à sa survie. Néanmoins, ils contrôlent la transcription des gènes impliqués dans les réponses au stress et la transcription des gènes exprimés pendant la phase stationnaire. Le plus représentatif de ce groupe est  $\sigma^S$  chez *E. coli* (Loewen and Hengge-Aronis, 1994).  $E\sigma^S$  reconnaît les mêmes séquences consensus des promoteurs que  $E\sigma^{70}$  (Gaal et al., 2001).

- **Groupe 3**

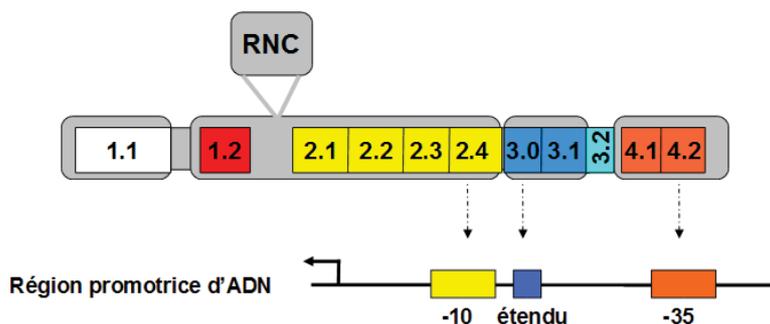
Ils diffèrent des sigmas primaires et sont plus divers structurellement et fonctionnellement. Ils n'ont pas la région 1.1, mais possèdent les domaines 2 et 4. Ils interviennent dans le contrôle des gènes impliqués dans le choc thermique ( $\sigma^{32}$ ), lors des programmes liés au développement comme la biosynthèse des flagelles ( $\sigma^F$  chez *E. coli*) ou lors de la sporulation ( $\sigma^H, \sigma^F, \sigma^E, \sigma^G, \sigma^K$  chez *B. subtilis*) (Mauri and Klumpp, 2014). Ils reconnaissent des promoteurs différents du groupe 1 et du groupe 2.

- **Groupe 4**

Il regroupe les facteurs sigma qui ont initialement échappé à la détection lors de la recherche d'homologie parce qu'ils ont perdu le domaine conservé  $\sigma$  1.1 (**Figure7**). Le séquençage à grande échelle du génome microbien a permis d'identifier des milliers de sigma. Le plus grand nombre de facteurs sigma appartient au groupe 4 et les plus abondants sont  $\sigma^{ECF}$  qui ont une fonction extra-cytoplasmique (Lonetto et al., 1992) . Ils pourraient transcrire des gènes impliqués dans les réponses au stress. Ils ont aussi des fonctions plus spécialisées comme le transport du fer ( $\sigma^{fexI}$ ). Ce groupe a conservé les régions 2 et 4 mais ont perdu la région 1.1 et la région 3 (Feklistov et al., 2014a).

### B.II.3 Principaux domaines structuraux des facteurs sigma

L'alignement des séquences des différents facteurs de la famille  $\sigma^{70}$  a révélé la présence de quatre domaines conservés  $\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3, \sigma_4$  (Campbell et al., 2002). Ceux-ci sont reliés entre eux par des bras flexibles et répartis sur une seule face de l'ARNP. Ces domaines sont formés des régions 1.1, 1.2 à 2.4, 3.0 à 3.2 et 4.1 à 4.2, respectivement (Murakami and Darst, 2003) (**Figure 8**).



**Figure 8.** Interactions entre les régions conservées du facteur  $\sigma^{70}$  et les différents éléments du promoteur. RNC : région non conservée.

#### B.II.3.1 Domaine $\sigma_1$

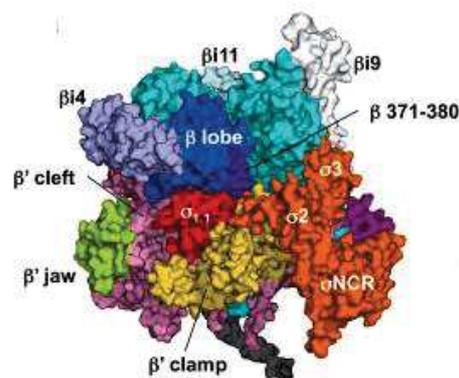
Le domaine  $\sigma_1$  est un domaine N-terminal du facteur sigma constitué d'une seule région  $\sigma_{1.1}$ . Ce domaine est composé de  $\sim 100$  acides aminés qui forment une séquence peu conservée bien que la caractéristique acide soit préservée (Murakami et al., 2002). Le domaine  $\sigma_1$  est présent seulement dans le groupe 1 des  $\sigma^{70}$ . La fonction principale de  $\sigma_{1.1}$  est l'auto-inhibition du facteur sigma libre car la conformation compacte du  $\sigma$  libre n'est plus capable de reconnaître le promoteur et les régions 2.4 et 4.2 ne sont pas bien positionnés pour interagir avec les éléments -10 et -35 du promoteur. C est le core de l'ARNP qui est responsable du

positionnement des domaines du sigma, de leur orientation et de leur espacement approprié pour interagir avec les motifs du promoteur (Feklístov et al., 2014a).

$\sigma_{1.1}$  semble jouer un rôle important dans la formation du complexe ouvert. Des études ont montré que plusieurs substitutions ou délétion des acides aminées de  $\sigma^{70}$  dans cette région ont diminué l'activité de l'ARNP et/ou diminué la stabilité du complexe ouvert (Miropolskaya et al., 2012; Vuthoori et al., 2001; Wilson and Dombroski, 1997) et l'étude cinétique de l'ARNP et de  $\sigma_{\Delta 1.1}$  montre que le domaine  $\sigma_1$  augmente le taux d'isomérisation (Wilson and Dombroski, 1997) et le taux de dissociation des complexes ouverts (Ruff et al., 2015).

La structure cristallographique de l'holoenzyme d'*E.coli* (Murakami, 2013) révèle que :  $\sigma_{1.1}$  est une région hélicoïdale chargée négativement qui contient quatre hélices. Cette région est entourée par  $\sigma_2$ ,  $\beta$  lobe,  $\beta'$  clamp et  $\beta'$  cleft (**Figure 9**). Les résidus acides de  $\sigma_{1.1}$  masquent les résidus basiques du  $\beta$  lobe et  $\beta'$  clamp.  $\sigma_{1.1}$  est placée dans le canal de fixation de l'ADN ; elle bloque complètement l'entrée de l'ADN double ou simple brin dans le site actif. La région  $\sigma_{1.1}$  doit sortir du site de liaison, ou bien l'élément clamp doit s'ouvrir davantage pour former un complexe ouvert (Chakraborty et al., 2012; Murakami, 2013).

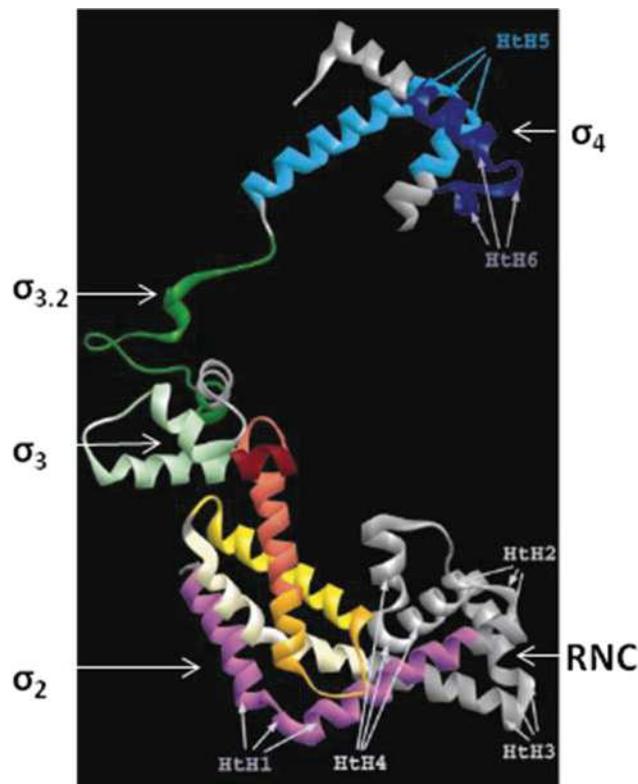
$\sigma_{1.1}$  contient trois résidus basiques (K10, R15 et K17 chez *E. coli*) à sa surface en face de l'extérieur du canal principal de l'ARNP (Murakami, 2013). Ces résidus avec les régions positivement chargées incluant le  $\sigma_2$ ,  $\beta$  lobe,  $\beta'$  clamp et  $\beta'$  jaw, forment une voie continue pour la fixation de l'ADN. La région  $\sigma_{1.1}$  peut jouer un rôle important dans la courbure de l'ADN pour former les complexes intermédiaires pendant la phase précoce entre le complexe fermé et le complexe ouvert (Murakami, 2013). Bien que la présence de résidus basiques de  $\sigma_{1.1}$  soit commune dans le groupe 1, la fonction de cette région basique lors de la transcription n'a pas été étudiée. Cette région basique pourrait contribuer à la formation du complexe ouvert (Murakami, 2013).



**Figure 9.** Structure de l'holoenzyme d'*E.coli* comportant  $\sigma^{70}$  (Murakami, 2013)

### B.II.3.2 Domaine $\sigma_2$

Le domaine  $\sigma_2$  est composé de huit hélices  $\alpha$  ( $\sigma_{74-254}$ ) incluant les quatre hélices turn hélice (HtH) : HtH1 (75-121), HtH2 (94-137), HtH3 (123-147) et HtH4 (152-203) (**Figure 10**).  $\sigma_2$  contient des régions conservées 1.2, 2.1, 2.2, 2.3 et 2.4 ainsi que le segment non conservé entre  $\sigma_{1.2}$  et  $\sigma_{2.1}$ . Parmi les quatre domaines structuraux de  $\sigma^{70}$ ,  $\sigma_2$  a les contacts les plus importants avec le core de l'ARNP par sa structure en U autour de l'hélice du domaine coiled coil de  $\beta'$  (540-585) (Murakami et al., 2002). Tous les résidus des régions conservées et non conservées du domaine  $\sigma_2$  exercent de multiples interactions fortes avec l'hélice  $\alpha$  de la sous unité  $\beta'$  (Vassylyev et al., 2002).



**Figure 10.** Structure du facteur sigma 70:  $\sigma_{1.2}$  (violet)  $\sigma_{2.1}$  (jaune clair)  $\sigma_{2.2}$  (jaune foncé)  $\sigma_{2.3}$  (orange)  $\sigma_{2.4}$  (rouge)  $\sigma_{3.0}$  (grenat)  $\sigma_{3.1}$  (vert clair)  $\sigma_{3.2}$  (vert)  $\sigma_{4.1}$  (bleu clair)  $\sigma_{4.2}$  (bleu foncé) RNC : région non conservée.

- **La région 1.2 ( $\sigma_{1.2}$ )**

c'est une région conservée parmi les facteurs  $\sigma$  primaire et alternatif (Lonetto et al., 1992). Les acides aminés de 94 à 101 de la région 1.2 interagissent avec la région 2 et avec l'élément  $\beta'$  coiled-coil et en conséquence stabilise la région 2.3 dans une conformation capable d'établir des interactions fortes avec l'élément -10. Donc la région 1.2 contrôle allostériquement la reconnaissance de l'élément -10 du promoteur par la région 2.3 de  $\sigma$  (Zenkin et al., 2007) au cours de l'initiation de la transcription et au cours de l'élongation.

Additionnellement les résidus 99 à 107 de la région 1.2 établissent des interactions spécifiques avec les nucléotides de l'élément discriminateur situé juste en aval de l'élément -10 (position -7 ou -6 ou -5, selon la distance entre l'élément -10 et le site d'initiation de la transcription). Ces interactions stabilisent le complexe ouvert de certains promoteurs (Haugen et al., 2006; Zhang et al., 2012). Cette région joue un rôle critique dans la reconnaissance et la fusion du promoteur (Baldwin and Dombroski, 2001; Brodolin et al., 2005).

La structure de l'ARNP avec de l'ADN contenant la bulle de transcription a montré que la base -6 du brin non matrice se fixe dans la poche de  $\sigma_{1.2}$  (Zhang et al., 2012) et que les bases -4 et -5 établissent aussi des contacts avec  $\sigma_{1.2}$  et le résidu Y101 de  $\sigma_{1.2}$  semblerait jouer un rôle particulièrement important dans les fonctions de  $\sigma_{1.2}$  au cours de la formation du complexe ouvert (Bochkareva and Zenkin, 2013; Zhang et al., 2012).

Après la formation du complexe ouvert, la région 1.2 et le domaine  $\beta$  lobe de l'ARNP coopèrent pour la fusion de l'ADN aval et facilitent ainsi la stabilisation des produits abortifs et leur extension (Bochkareva and Zenkin, 2013).

Les études sur le promoteur rrnB P1 d'*E.coli* ont mis en évidence l'implication des résidus spécifiques de la région 1.2 de  $\sigma^{70}$  avec la séquence de l'élément discriminateur (Gourse et al., 1996) dans la détermination du taux de dissociation du complexe RPo. Cette séquence riche en GC semble interférer avec la formation du complexe ouvert stable (Tare et al., 2013).

- **Région 2.1 ( $\sigma_{2.1}$ )**

$\sigma_{2.1}$  est impliquée dans l'interaction avec le domaine coiled-coil de l'ARNP. Elle est composée de deux hélices  $\alpha$ . La plupart des résidus conservés dans cette région sont impliqués dans des interactions fortes avec l'ARNP (Malhotra et al., 1996).

Ils représentent 23 % des interactions de  $\sigma_2$  et l'élément-10 (Feklistov et Darst, 2011).  $\sigma_{2.1}$  est nécessaire à l'ouverture du promoteur et à la formation du complexe RPo (Anthony et le Citoyen, 2002).

- **Région 2.2 ( $\sigma_{2.2}$ )**

Le premier contact entre le core de l'ARNP et  $\sigma_2$  implique la surface polaire de la région 2.2 et le motif coiled-coil de la sous unité  $\beta'$  de l'ARNP. C'est une des interactions majeures entre le facteur sigma et l'ARNP (Campbell et al., 2002; Yang and Lewis, 2010).  $\sigma_{2.2}$  est la région la plus fortement conservée du facteur sigma (Malhotra et al., 1996). Les résidus conservés dans cette région interagissent avec le brin non matrice de l'ADN (Murakami et al., 2002). Chez *T. aquaticus*  $\sigma^A$ , le résidu R237 forme une liaison hydrogène avec la base T<sub>-12</sub> de l'élément -10 (Feklistov and Darst, 2011). Plusieurs mutants de cette région ont été isolés sur la surface exposée de  $\sigma_{2.2}$ . Ils sont incapables de se lier au core de l'ARNP (Arthur et al., 2000; Sharp et al., 1999) et empêchent le domaine coiled-coil d'établir la liaison avec l'ADN (Q406A, E407K chez *E. coli*) (Young et al., 2001).

- **Région 2.3 ( $\sigma_{2.3}$ )**

La région 2.3 contient des résidus aromatiques universellement conservés. Quatre résidus aromatiques Y425, Y430, W433 et W434 chez *E. coli* (F248, Y253 et W256 chez *T. aquaticus*) sont idéalement placés pour interagir avec les nucléotides qui sont exposés à la surface de la partie amont de la bulle de transcription. Ces résidus jouent un rôle important dans la nucléation de l'ADN et la stabilisation du complexe ouvert (Murakami, 2015). Les mutations de ces résidus entraînent une augmentation de la température de fusion de l'ADN du promoteur pendant l'initiation de transcription. Cela confirme que leur rôle est important dans la séparation des brins d'ADN (Schroeder et al., 2007). La substitution de l'acide aminé G424R dans la région 2.3 conduit également à une diminution de l'efficacité de la pause. Cette substitution est placée dans une boucle qui peut affecter les changements de conformation de sigma au cours des interactions avec l'ARNP et l'ADN (Zhilina et al., 2011).

- **Région 2.4 ( $\sigma_{2.4}$ )**

La région 2.4 à une hélice amphipathique contenant des résidus hydrophobes contribuant à l'interaction directe avec les bases de l'élément -10 du promoteur qui est reconnu spécifiquement d'abord sous la forme de duplex par  $\sigma_{2.4}$ . Ensuite, les bases de cet élément sont reconnues par la région conservée 2.3 après l'ouverture du promoteur (Feklistov and Darst, 2011). Le résidu Q437 chez *E. Coli* (Q260 chez *T.aquaticus*) est conservé chez les facteurs sigma du groupe 1 (Campbell et al., 2002; Gruber and Bryant, 1997). Sa substitution par H ou R permet une transcription efficace des promoteurs mutants ayant C à la place de T à la position -12 (Kenney et al., 1989; Waldburger et al., 1990).

Q260 et d'autres résidus de  $\sigma_{2.4}$  se trouvent sur une longue hélice perpendiculaire à la trajectoire de l'ADN double brin du promoteur (Murakami et al., 2002). Il semble qu'ils ne peuvent pas établir d'interactions spécifiques avec l'élément -10 dans le complexe fermé (RPC). La modélisation structurale (Feklistov and Darst, 2011) suggère que le contact de Q260 avec les bases en position -12 de l'élément -10 intervient seulement lorsque l'ouverture des brins du promoteur est réalisée à la position -11 permettant ainsi le rapprochement de la position -12 de l'hélice de  $\sigma_{2.4}$ .

### B.II.3.3 Domaine $\sigma_3$

C'est un domaine compact constitué de 3 hélices  $\alpha$  (Helmann and Chamberlin, 1988; Murakami and Darst, 2003; Paget and Helmann, 2003) (**Figure 10**). C'est le moins conservé parmi les membres de la famille de  $\sigma^{70}$ . Par contre, les sigma ECF ( $\sigma^{ECF}$ ) ont complètement perdu le domaine 3 qui a été remplacée par une séquence plus courte qui connecte les régions 2 et 4 (Gruber and Gross, 2003). Ce domaine contient des résidus impliqués dans le contact avec l'élément -10 étendu du promoteur (T<sub>-15</sub> G<sub>-14</sub> chez *E. coli*) (Campbell et al., 2002; Paget and Helmann, 2003). Il se situe au-dessus du site actif de l'enzyme et interagit principalement avec la sous-unité  $\beta$ . Il contient les régions 3.0, 3.1 et 3.2 (Gruber and Gross, 2003; Murakami and Darst, 2003).

- **Région 3.0 (anciennement 2.5)**

Elle reconnaît le motif TG positionné en amont de l'élément -10 sur les promoteurs -10 étendus (Campbell et al., 2002). Les interactions spécifiques se font par l'intermédiaire des résidus (E458, H455 et E458 chez *E. coli*) et sont assez fortes pour stabiliser le complexe d'initiation. Elles rendent les promoteurs indépendants de l'interaction entre la région 4.2 et l'élément -35 (Barne et al., 1997; Murakami et al., 2002). L'interaction avec le promoteur se fait aux environs

des positions -17 à -13 (Bown et al., 1999; Murakami and Darst, 2003). La substitution de ces trois résidus entraîne une réduction de formation de RPo, Cela confirme leur importance (Feng et al., 2016). Cette région joue un rôle important dans la sélection des promoteurs de nombreuses bactéries (kerry AB region 2.5 1997).

- **Région 3.1 ( $\sigma_{3.1}$ )**

Elle est formé d'un motif helix-turn-helix situé au contact de la face hydrophobe de la région 3.0. Rien ne prouve que cette région de sigma participe à la fixation de l'ADN. Les substitutions dans cette région affectent la liaison du core de l'ARNP avec l'ADN du promoteur (Campbell et al., 2002). La région 3.1 interagit avec la partie C-terminal de la sous-unité  $\beta$  qui comprend les éléments H et I (Gruber et al., 2001).

- **Région 3.2 ( $\sigma_{3.2}$ )**

C'est une région (résidus 498-526 chez *E. coli*) qui forme un long domaine de liaison non structuré reliant les domaines 2 et 4 impliqués dans la reconnaissance du promoteur. Dans les facteurs sigma primaires, la région 3.2 est fortement conservée et contient plusieurs acides aminés chargés négativement au niveau de la boucle. Les séquences de cette région diffèrent significativement dans les sigmas alternatifs, mais les résidus chargés négativement gardent la même position (Gruber and Gross, 2003; Pupov et al., 2014), tandis que les facteurs sigma du groupe 4 ont complètement perdu cette région (Gruber and Gross, 2003).

La région 3.2 forme une boucle en épingle à cheveux qui avance vers le site actif de l'ARNP et occupe partiellement le canal de sortie de l'ARN. Il a été proposé que la région 3.2 joue un rôle important dans plusieurs fonctions après l'étape de reconnaissance du promoteur (Kulbachinskiy and Mustaev, 2006; Murakami et al., 2002; Zhang et al., 2012).

- En particulier, le positionnement de l'ADN au niveau du site actif (Belogurov et al., 2009; Pupov et al., 2010).
- Il a été démontré également qu'elle stimule la fixation (iNTPs) dans le site actif de l'ARNP (Murakami et al., 2002; Zenkin and Severinov, 2004) et la délétion de 7 résidus de la boucle  $\sigma_{3.2}$  entraîne une augmentation de  $K_m$  pour l'initiation de NTP en 3'-RNA (Feklístov et al., 2014b; Kulbachinskiy and Mustaev, 2006). Cependant, une autre étude propose que l'effet de la boucle sur l'initiation de NTP est indirect et est lié à la préorganisation de l'ADN (Zhang et al., 2012). Notamment,  $\sigma_{3.2}$  est beaucoup plus

court dans le sigma alternatif (Campbell et al., 2003), et cela indique un mécanisme d'initiation simplifié dans ce groupe avec une capacité de fusion réduite.

- Elle participe à l'initiation abortive et à la stabilisation des transcrits courts (Zenkin and Severinov, 2004).
- Elle facilite la séparation de l'ARNP du promoteur, probablement en rivalisant avec l'extension de l'ARN dans le canal de sortie de l'ARN (Murakami et al., 2002; Samanta and Martin, 2013).

Chez les eucaryotes, le facteur de transcription TFIIB assure des fonctions similaires à celles de la région 3.2 chez les procaryotes. Il joue probablement un rôle dans l'initiation de la transcription et participe à la séparation de l'ARNP des promoteurs (Kostrewa et al., 2009; Sainsbury et al., 2013). La région B-reader de TFIIB occupe une position similaire dans le canal de sortie de l'ARN et contacte le brin matrice de l'ADN. Elle joue un rôle dans la stabilisation du brin matrice et la stabilisation de l'hybride ARN-ADN dans le centre actif (Sainsbury et al., 2013). De même que la région 3.2, la boucle de B-reader bloque le passage de l'ARN. Il a été proposé qu'elle joue un rôle dans la séparation des produits courts de l'ARN. Les régions 3.2 et B-reader contiennent des résidus conservés qui sont chargés négativement à l'extrémité de leur boucle (Sainsbury et al., 2013).

#### **B.II.3.4 Domaine $\sigma_4$**

Le domaine 4, (340-423 chez *E. coli*), est en forme de C et est composé de quatre hélices, formant deux motifs HtH : HtH5 et HtH6 (Vassylyev et al., 2002) (**Figure10**). Il a une poche concave ayant en surface les résidus hydrophobes de la région 4.1 (Murakami and Darst, 2003).

- **Région 4.1 ( $\sigma_{4.1}$ )**

Elle est formée des hélices  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  et possède plusieurs résidus hydrophobes qui interagissent avec  $\beta$  flap. La mutation de certains de ces résidus entraîne la perte de liaison avec le core de l'ARNP, donc cette région joue un rôle important dans l'interaction du core de l'ARNP avec le facteur  $\sigma$  (Sharp et al., 1999).

Elle contacte aussi le domaine  $\beta'$  ZBD au niveau de l'extrémité C-terminal de l'hélice  $\alpha_2$ . Ce contact pourrait contribuer au positionnement de la région 4 sur le domaine  $\beta$  flap (Geszvain et al., 2004; Vassylyev et al., 2002) permettant de placer correctement la région 4 par rapport à la région 2 et par conséquent, permettrait aussi le contact simultané avec les éléments -35 et -10 du promoteur (Paget and Helmann, 2003).

- **Région 4.2 ( $\sigma_{4.2}$ )**

Elle est formée de l'hélice  $\alpha_3$  et  $\alpha_4$ . Elle établit la première interaction entre le facteur  $\sigma$  et l'ADN permettant ainsi la reconnaissance spécifique de l'élément -35. Cette interaction génère une courbure de  $30^\circ$  dans l'ADN qui rapproche la partie amont de l'ADN de l'ARNP (Zuo and Steitz, 2015). Ceci améliore l'interaction en amont de l'élément -35 entre le  $\alpha$ -CTD de l'ARNP et l'ADN et améliore aussi l'interaction avec les activateurs de la transcription au cours de l'initiation (Murakami and Darst, 2003).

#### **B.II.4 Différents types de promoteurs reconnus par le facteur $\sigma$ (Figure 11).**

Les promoteurs sont reconnus de façon spécifique par l'ARNP via le facteur sigma qui lui est associé. Cette reconnaissance constitue un point de contrôle important de la régulation de la transcription des gènes.

##### **Classe -10 -35 :**

Les deux éléments principaux des promoteurs de cette classe sont -10 et -35. Ce sont des séquences hexanucléotidiques relativement bien conservées. Leur séquence consensus est TATAAT (ou Pribnow box) et TTGACA (Feklistov and Darst, 2011). Ces deux éléments sont localisés respectivement à 10 et à 35 paires de base en amont du site du début de transcription (Browning and Busby, 2004; Busby and Ebright, 1994). Ils sont séparés par 17 pb ; cet espacement peut varier de 15 à 19 pb, mais il est généralement bien conservé, ce qui n'est pas le cas de leur séquence.

La force du promoteur sera déterminée par le degré de conservation des éléments -35 et -10 par rapport aux séquences consensus. Il a été montré également que les promoteurs dont l'espacement est de 17 pb sont plus efficaces *in vitro* et *in vivo* que les promoteurs qui ont une longueur inter-hexamérique de 15 ou 19 pb. Cet espacement module l'interaction du facteur sigma avec le promoteur. Le changement de la longueur de 17 pb à 16 pb entraîne une rotation du domaine  $\sigma_4$  de 5 degrés. La variation de longueur est limitée par le nombre de rotations que le domaine  $\sigma_4$  peut effectuer (Zuo and Steitz, 2015). Cette différence d'espacement affecte la stabilité du complexe ouvert (RPO) (Ayers et al., 1989; Mulligan et al., 1985). L'espacement optimale entre l'élément -10 et le site d'initiation de la transcription est de 7 pb, Il module également l'interaction entre  $E\sigma^{70}$  et le promoteur (Walker and Osuna, 2002).

L'élément -10 est le motif du promoteur bactérien le plus fortement conservé et il est essentiel pour la plupart des promoteurs. Il joue un rôle important dans la nucléation du promoteur au cours de la formation du complexe RPo.

- **Classe -10 étendu :**

Les promoteurs de cette classe ont un motif 5'-TRGn-3' supplémentaire (où n représente une base) immédiatement situé en amont de l'élément -10. 60% approximativement des gènes des bactéries gram-positifs sont transcrits à partir de la classe des promoteurs -10 étendus (Bashyam and Tyagi, 1998). Des mutations dans le motif TGn réduisent significativement l'activité in vivo de ces promoteurs chez *Mycobacterium*. Il a été suggéré que la séquence -10 étendu facilite la fixation de l'ARNP sur le promoteur en l'absence de l'élément -35 ou lorsque la séquence -10 est faiblement conservée ou quand la longueur inter-hexamérique est longue (Mitchell, J.E.; Zheng, D.;2003).

Bien que -10 étendu reste en double brin au cours de l'initiation de la transcription le changement de cette séquence affecte principalement le taux d'isomérisation mais il n'affecte pas la formation du complexe fermé (Feklistov et al., 2014a; Saecker et al., 2011).

La région 3 de  $\sigma^{70}$  interagit avec la séquence TG. Cette interaction peut jouer un rôle dans la formation du complexe ouvert pendant l'initiation de la transcription et donc moduler la force du promoteur (Newton-Foot and Gey van Pittius, 2013). Ce type de promoteur est peu présent chez *E. coli* (exemple chez *E. coli* : *galP1*) (Camacho and Salas, 1999; Voskuil and Chambliss, 2002).

- **L'élément UP :**

Quelques promoteurs peuvent inclure l'élément UP (~ 20pb) situé entre les positions -80 et -40 en amont de l'élément -35 et -10. Cet élément augmente la transcription en interagissant avec le domaine C-terminal de la sous-unité  $\alpha$  de l'ARNP ( $\alpha$ CTD). Il a été proposé que la partie amont de l'ADN s'enroule autour de l'ARNP lors de l'initiation et induit une courbure de l'ADN. Cette interaction contribuerait probablement à la fusion et à la stabilisation de la bulle de transcription (Ross and Gourse, 2005; Zenkin and Severinov, 2004). L'élément UP permet également l'initiation de la transcription en l'absence de l'élément Lid (Toulokhonov and Landick, 2006).

L'élément UP le mieux caractérisé est celui du promoteur *rrnBP1* riche en adénine (A) et en thymine(T). La séquence consensus est 59 nnnAAA(A/T)(A/T) T(A/T) TTTTnnAAAAnnn -38 (Estrem et al., 1998). Cet élément a été identifié dans d'autres promoteurs d' *E. coli*, dans

d'autres espèces bactériennes et dans des promoteurs transcrits par des holoenzymes contenant le facteur sigma alternatif (Ross et al., 2001).

- **Élément discriminatoire :**

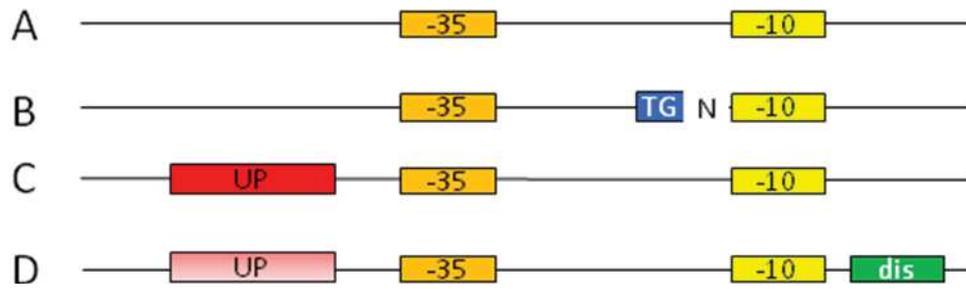
C'est une séquence de 6 à 8 bases riche en G+C située entre l'élément -10 et le site d'initiation de la transcription dans les promoteurs d'ARNr et d'ARNt. Les bases de cette séquence ne sont pas fortement conservées chez les promoteurs d'*E.coli*. Les séquences contenant une guanine en position -5 ont des interactions plus fortes avec la région 1.2 de  $\sigma^{70}$ . Cette interaction affecte le taux de dissociation de RPo vers RPi qui est un déterminant majeur de la sensibilité des promoteurs d'ARNr et de la sensibilité d'autres promoteurs régulés négativement par ppGpp et DksA (Bochkareva and Zenkin, 2013). L'élément discriminatoire est nécessaire à la fusion de l'ADN duplex en amont du site d'initiation de la transcription et joue un rôle particulièrement important au cours de la formation du complexe ouvert (Haugen et al., 2008) et participe à sa stabilité et sa durée de vie (Ruff et al., 2015).

Pour le promoteur  $\lambda$ Pr dont l'élément discriminatoire est constitué de 6 bases dans lesquelles les bases G/G sont en position -6/-5, la stabilisation est forte ( $K_3(\text{equilibrium constante}) > 10^5$ ) (Kontur et al., 2008). Pour T7A1, dont l'élément discriminatoire est constitué de 7 bases dans lesquelles les bases T/A sont en positions -7/-6, la stabilisation est significativement plus modeste (Ruff et al., 2015). Le complexe RPo de T7A1 a une durée de vie et une structure analogues à celles de l'intermédiaire I3 du promoteur  $\lambda$ Pr (Ruff et al., 2015).

Pour le promoteur rrnB P1 dont l'élément discriminatoire est constitué de 8 bases dans lesquelles les bases G/C sont en position -8/-7, le complexe RPo a une durée de vie courte et une thermodynamique relativement instable. Il est l'analogue de I2 des promoteurs  $\lambda$ Pr et T7A1 (Ruff et al., 2015). La courte durée de vie du complexe est nécessaire à la réponse au changement de l'environnement nutritionnel qui va servir de signal à la traduction cellulaire (Paul et al., 2004b).

La substitution de -7C par G a augmenté de 40 fois la durée de vie du RPo (Haugen et al., 2006; Ruff et al., 2015).

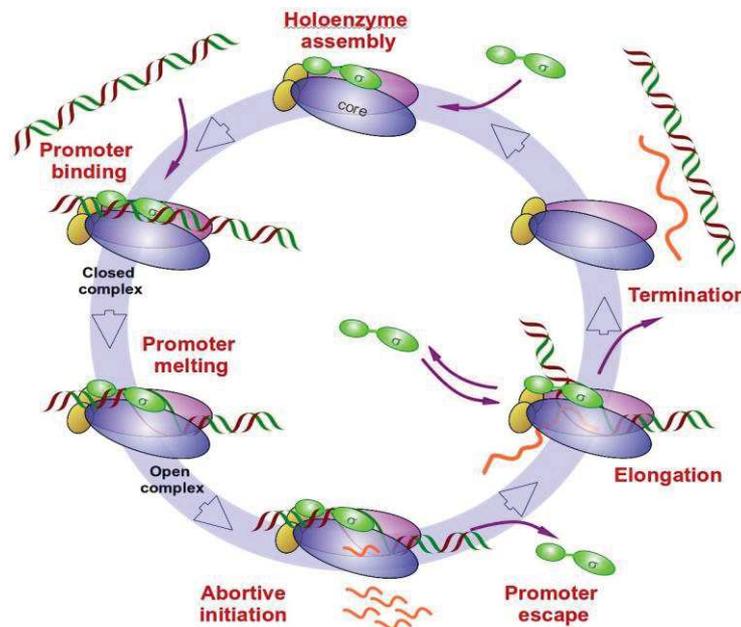
Mais les promoteurs présentant une forte interaction entre le discriminatoire et  $\sigma_{1,2}$  augmentent leur activité et perdent leur régulation par ppGpp/DKsA et par la concentration iNTP (Haugen et al., 2006).



**Figure 11.** Différents types de promoteurs bactériens: **A** Promoteur procaryotique classique -10 -35. **B** Promoteur -10 étendu. **C** Promoteur à élément UP. **D** Promoteur comportant un élément discriminateur.

## C. Cycle de transcription

La transcription, première étape de l'expression des gènes, est un processus hautement régulé. Le cycle de transcription est divisé en trois étapes principales : initiation, élongation et terminaison.



**Figure 12.** Différentes étapes du cycle de transcription procaryote

### C.I) Initiation

#### C.I.1 Formation du complexe fermé : R<sub>Pc</sub>

Le core de l'ARNP effectue toutes les étapes principales de la transcription sauf l'initiation spécifique au niveau du promoteur car il nécessite une sous-unité supplémentaire qui est le facteur sigma pour former l'holoenzyme. Celle-ci va interagir avec l'ADN du promoteur et former un complexe fermé instable dont l'ADN est en double brin (**Figure 13**).

Dans le complexe R<sub>Pc</sub>, les régions 2 et 4 de  $\sigma$  reconnaissent respectivement les éléments -10 et -35 du promoteur. Le domaine  $\alpha$ CTDs de l'ARNP permet une interaction non spécifique avec la partie amont de l'ADN ( $\sim -90$ ) ou spécifique avec l'élément UP des promoteurs tels que  $\lambda$ Pr, T7A1 ou *rrnB* P1 et des interactions avec les activateurs qui se fixent en amont de l'élément -35. Ces interactions induisent une courbure de l'ADN de  $36^\circ$  entre les positions -48 et -38

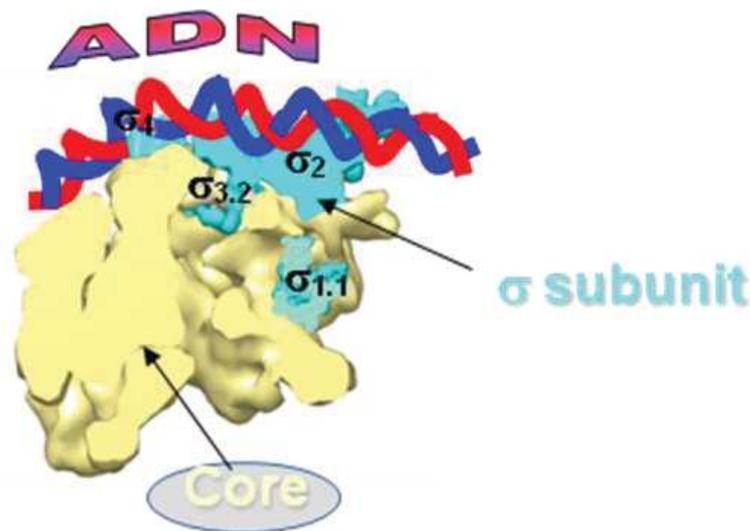
(Davis C A 2005), qui permet également une interaction optimale entre ADN,  $\alpha$ CTDs et les activateurs.

L'interaction entre l'ADN et  $\alpha$ CTD induit également le contact avec la région 4 de  $\sigma^{70}$ . Les mutations des résidus dans l'interface entre la région 4- $\alpha$ CTD réduisent la transcription de certains promoteurs, mais n'agissent pas sur la totalité des promoteurs contenant l'élément UP (Rhodius et al., 2013; Ring et al., 1996; Saecker et al., 2011).

Dans le complexe fermé, l'holoenzyme protège le promoteur de la position -54 à -5 de l'action de la DNase I et du clivage par les radicaux hydroxyl (Rogozina et al., 2009; Sclavi et al., 2005). Mais l'ADN aval (-5 à +20) se trouvant à l'extérieur du canal principal de l'ARNP n'est pas protégé de l'action de la DNase I car les éléments mobiles de l'ARNP au niveau du canal principal bloquent l'accès à l'ADN (Saecker et al., 2011).

Pour les promoteurs à motif -10 étendu, les résidus (H455; E458 et R451 chez *E. coli*) de la région 3.0 de  $\sigma$  reconnaissent le motif -16 TG en amont de l'élément -10 (Bae et al., 2015).

Dans le complexe fermé, la région 1.1 de  $\sigma$  est située dans la partie aval du canal primaire (Bae et al., 2013) et la région 3.2 forme une boucle qui pénètre dans le canal principal et occupe partiellement le canal de sortie de l'ARN (**Figure 13**).



**Figure 13.** Représentation schématique du complexe fermé

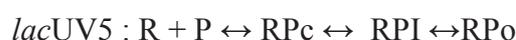
### C.I.2 Etapes intermédiaires entre RPc et RPo

La formation du complexe fermé RPc initie une série de changements conformationnels au niveau de l'ARNP et de l'ADN. Cette série de changements est appelée "isomérisation". Selon les types de promoteurs, plusieurs complexes intermédiaires peuvent être formés de façon séquentielle avant la formation du RPo. Les interactions entre l'ADN et l'ARNP, faibles dans RPc, deviennent plus fortes dans le complexe intermédiaire. L'analyse chimique a montré que la reconnaissance de l'élément -10 et l'ouverture de l'ADN sont deux phénomènes couplés (Feklístov et al., 2014a). Au cours de l'isomérisation, les contacts entre  $\sigma_2$  et l'élément -10 dans le complexe fermé sont remplacés par des interactions entre les résidus aromatiques conservés de  $\sigma_2$  et les bases du brin non matrice de la position -11 à la position -7. Ces interactions sont maintenues après l'ouverture de l'ADN à l'exception de la base -12 qui reste en double brin. (Darst et al., 2014; Zuo and Steitz, 2015).

Beaucoup d'études suggèrent que la formation de la bulle de transcription commence à la position A-11 et se propage ensuite en aval vers le site du début de transcription (+1) ; (Chen et al., 2010; Hook-Barnard and Hinton, 2007; Lim et al., 2001). Tous les résidus aromatiques conservés du domaine 2 sont importants pour le début de l'ouverture de la bulle de transcription (F419, Y430, W433, W434 chez *E. coli*). Ces résidus forment une cavité d'insertion de la base A-11 et stabilisent la jonction entre l'ADN double brin et l'ADN simple brin formé par la rotation de la base A-11 (Feklístov and Darst, 2011). L'interaction de l'élément -10 avec  $\sigma_2$  induit une courbure de l'ADN. Cette courbure induit l'insertion de l'ADN aval dans le canal principal et entraîne de profonds remaniements conformationnels, notamment au niveau des éléments switch, conduisant à l'ouverture du clamp et à la sortie de la région 1.1 du canal principal (Feklístov et al., 2014a).

La région  $\sigma_3$  interagit avec les bases TG de l'élément -10 étendu. Cette interaction joue un rôle important dans les étapes qui suivent la liaison de l'holoenzyme avec le promoteur (Feklístov et al., 2014a).

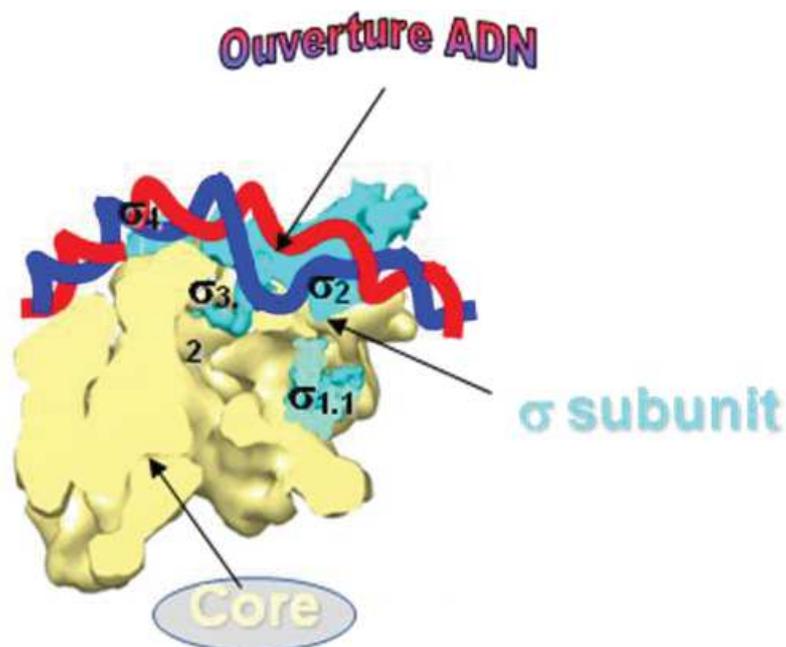
Des études de cinétique et de footprint ont été utilisées pour déterminer les changements conformationnels et la nature des complexes intermédiaires des promoteurs  $\lambda$ PR et *lac*UV5 qui accomplissent trois étapes conduisant à la formation du complexe ouvert. Ces intermédiaires sont instables et ont une durée de vie de 1ms à 1s (Saecker et al., 2011).



Les structures intermédiaires de ces deux voies sont significativement différentes : pour le promoteur *lac* UV5, le RPc est fermé et stable tandis que pour le promoteur  $\lambda$ PR, le

complexe I1 est fermé, mais avec une protection de l'ADN jusqu'à la position +20. Au cours de l'isomérisation, I1 se convertit en un complexe intermédiaire I2 qui est ouvert et instable et forme rapidement un RPo plus stable.

La formation de RPo ou d'I1 se fait de façon rapide alors que la conversion vers I2 se fait de façon lente. 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 et une phase lente correspondant à la formation d'un complexe ouvert stable RPo. L'étape I1 vers I2 est réversible et constitue un site de régulation potentiel de la transcription (Saecker et al., 2011).



**Figure 14.** Représentation schématique du complexe intermédiaire et positionnement de l'ADN au niveau du canal principal

### C.I.3 Formation du complexe ouvert

La dernière étape de l'isomérisation est la formation du complexe ouvert avec un grand changement de conformation de l'ARNP et de l'ADN du promoteur. L'holoenzyme contacte l'ADN double brin et le déroule de -11 à +3 sans utiliser d'énergie externe. Ces contacts avec les bases de -36 à -30 et de -17 à +9 sont observés lors du clivage par les radicaux hydroxyls du complexe RPo, mais on n'observe pas d'interactions entre les positions -29 et -18 (Bae et al., 2015) Dans la structure du RPo du *T. aquaticus*, en plus des interactions de  $\sigma 4$  et l'élément -35, on trouve également des interactions entre le domaine  $\beta'$ Zipper,  $\sigma 3$  et  $\sigma 2$  et les bases de la position -17 à -12 (Saecker et al., 2011).

Les résidus conservés dans le domaine  $\beta'$  Zipper Y34 et R35 établissent des interactions polaires avec le phosphate de la base -17 du brin codant de l'ADN et contribuent à la stabilité du RPo (Barne et al., 1997; Yuzenkova et al., 2011).

De nombreuses interactions de  $\sigma 3$  et  $\sigma 2$  se produisent avec l'ADN duplex juste en amont de la bulle de transcription au niveau de la position -17 à -12. Les résidus H 278 et H 274 (H455 et R451 chez *E.coli*) interagissent respectivement avec les phosphates des bases -17 et -16. La substitution de ces résidus entraîne des défauts dans la liaison avec le promoteur (Barne et al., 1997; Fenton et al., 2000; Singh et al., 2011).

La reconnaissance spécifique de l'ADN duplex de l'élément -10 étendu (T<sub>-15</sub>G<sub>-14</sub>) est effectuée par les résidus conservés E281 et R264 chez *T. aquaticus* (E458 et R441 et chez *E.coli*). Ces interactions polaires avec les bases TG (Barne et al., 1997) stabilisent le RPo et remplacent l'interaction de  $\sigma 4$  et de l'élément -35 (Keilty and Rosenberg, 1987).

La base T-12 du brin non matrice interagit avec les résidus W 256 et W 257 chez *T. aquaticus* (W433 et W434 chez *E.coli*) pour maintenir la jonction et la stabilisation de l'ADN double brin et de l'ADN simple brin (position -12 et -11) en amont de la bulle de transcription. Les substitutions de ces deux résidus diminuent de 2 ou 3 fois le taux d'isomérisation à 37°C, alors qu'à une température de 25°C, l'effet de la substitution W433A est plus important, aboutissant à une réduction de sept fois le taux d'isomérisation (Feng et al., 2016; Tomsic et al., 2001).

Le résidu W256 joue un rôle critique dans la formation et la stabilité de complexe RPo.

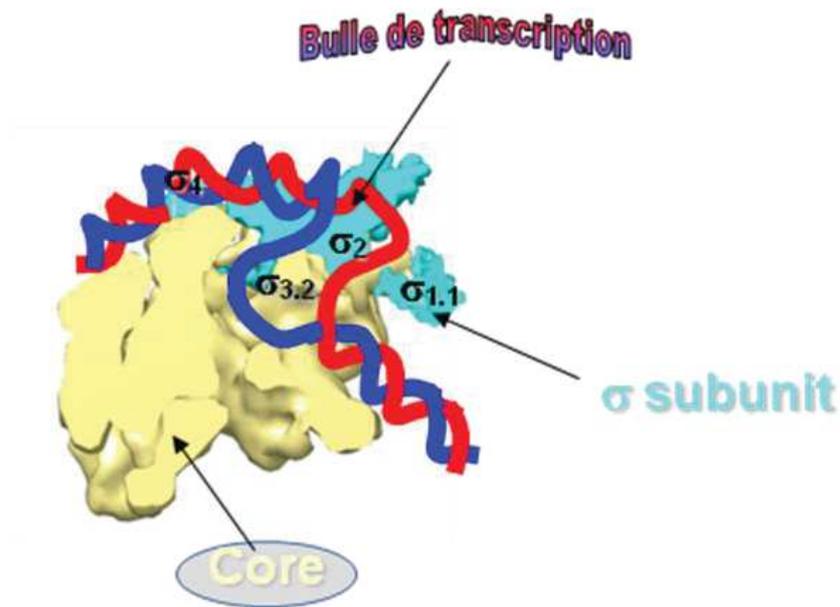
La séparation des brins d'ADN commence quand W256 interagit avec A-11 de l'élément -10. Ce phénomène induit la rotation de la base et son ancrage dans une poche hydrophobe de  $\sigma 2$ . Cette poche est composée des résidus Y253, R246, F242 et F248 chez *T. aquaticus* qui interagissent avec A-11. En l'absence d'ADN, la chaîne située à côté de R246 est libre. Elle a une configuration ouverte, permettant à la base A-11 de se glisser dans la poche. Cette chaîne est stabilisée par E243 et par le phosphate de la base de T-12 quand A-11 est dans la poche.

La base A-11 est très fortement conservée dans l'élément -10 car sa poche a une forme qui est adaptée seulement à la base A, et non aux autres bases car une mutation à la position -11 aurait un effet important sur la fusion de l'ADN (Feklistov and Darst, 2011).

Les résidus de  $\sigma_{2,3}$  contactent le brin codant de l'ADN du promoteur. Ce contact est suivi par le déroulement de l'ADN et induit une courbure de  $90^\circ$  de l'ADN entre la position -10 et -9 (Feklistov and Darst, 2011).

Chez *T. aquaticus* le résidu conservé T252 (T429 chez *E. coli*) interagit avec le phosphate de la base -9 et joue un rôle critique dans la fusion de l'ADN et T255 interagit avec la base -8. Ces résidus causent la rotation de la base T-7 et son ancrage dans la poche hydrophile qui est composée des résidus de la région 1.2, 2.1 et 2.3. Cet ensemble d'interactions et la reconnaissance de l'élément discriminatoire pourraient être un «check-point» au cours de la propagation de la fusion de l'ADN vers le site d'initiation de la transcription (Feklistov and Darst, 2011).

Le changement de conformation du core induit le repliement et l'assemblage de 100 résidus du domaine mobile  $\beta'$  (clamp) et  $\beta$  jaw pour former le domaine clamp/jaw qui va interagir avec la partie aval de l'ADN (~15 bp) (Zuo and Steitz, 2015). Cette interaction stabilise le RPo (Murakami and Darst, 2003). L'élément switch 2 contacte le brin matrice en position -2 et -3 permettant ainsi son positionnement dans le site actif de l'ARNP. Les interactions avec trigger loop de la position +1 à +3 et lobe vont favoriser la poursuite de la séparation de l'ADN aval et la formation de la bulle de transcription qui s'étend sur environ 14 pb. La délétion dans la sous-unité lobe ou les mutations dans  $\beta'$  switch 2 bloquent la propagation de la fusion vers le site d'initiation de la transcription.



**Figure 15.** Représentation schématique du positionnement de l'ADN amont et de l'ADN aval lors de la formation du complexe ouvert.

### C.II) Initiation abortive

Le cycle abortif est marqué par la sortie prématurée des produits courts de l'ARN au cours de l'initiation de la transcription. C'est une caractéristique commune à tous les ARNPs (Carpousis and Gralla, 1980; Martin et al., 1988) et probablement un point de la régulation cellulaire pour quelques promoteurs (Jin and Turnbough, 1994). Le positionnement du brin matrice dans le site actif et l'arrivée des NTPs par le canal secondaire induisent la formation de la première liaison phosphodiester entre deux NTPs complémentaires du brin matrice au niveau des sites  $i$  et  $i+1$  du site actif. L'ARNP synthétise des fragments d'ARN et quand le transcrit est de 4 ou 5 nt, il peut être maintenu dans le canal de l'ARNP. Lorsque les transcrits atteignent une longueur de 9 nt, ils sont relâchés par le canal secondaire. Cela est dû à la position de  $\sigma_{3.2}$  qui bloque le canal de sortie de l'ARN. Les interactions avec le transcrit sont déstabilisées et conduisent au relâchement du brin d'ARN. Afin de continuer sa synthèse, le brin d'ARN devra déplacer la boucle  $\sigma_{3.2}$  (Samanta and Martin, 2013; Vassylyev et al., 2002). La substitution de deux résidus conservés de  $\sigma_{3.2}$  (P504 et S506 chez *E. coli*) a entraîné une réduction du ratio des transcrits abortifs courts (4-8 nt) par rapport aux transcrits longs (Sen et al., 1998). La délétion de sept résidus au bout de la boucle se traduit par une diminution relative des transcrits courts <10 nucléotides. La délétion complète de la région 3.2 a mené à l'élimination presque complète des transcrits abortifs intermédiaires (Murakami et al., 2002).

Quand le transcrit atteint 16 nucléotides, il induit une rupture de l'interaction entre  $\sigma_4$  et le domaine  $\beta$  flap. La liaison entre  $\sigma_4$  et l'élément -35 du promoteur est alors déstabilisée. Cela engage le processus de séparation de l'ARNP du promoteur et entraîne le passage de la phase d'initiation à la phase d'élongation. Pendant l'initiation abortive, l'ARNP recommence plusieurs fois le cycle d'initiation sur le promoteur sans se détacher du brin matrice (Feklístov et al., 2014b).

Au cours de l'initiation de la transcription, l'ARNP reste associée à l'ADN amont du promoteur tandis que la partie avale s'ouvre et pénètre dans l'ARNP. Ce déplacement lors de la synthèse de l'ARN induit le «DNA scrunching» qui va générer du stress à l'intérieur de l'enzyme. Il a été suggéré que ce processus soit l'élément moteur de l'initiation abortive et de la séparation de l'ARNP du promoteur lors de la synthèse productive de l'ARN (Kapanidis et al., 2006; Revyakin et al., 2006). Ce processus reste inexplicé.

Le nombre et la longueur des produits abortifs produits dépendent de la séquence du promoteur et des conditions, mais "les règles" précises dirigeant ce processus restent inconnues. Cependant, des ARN abortifs ont été détectés *in vivo* (Goldman et al., 2009). Cette découverte accroît la possibilité que les produits courts (2-4mers) se lient au RPo, puis amorcent l'initiation *in vivo* et changent l'expression des gènes selon leur concentration (Goldman et al., 2009).

### **C.III) Elongation**

Après les nombreux cycles d'initiation abortive,  $\sigma_{3.2}$  est finalement déplacé par le transcrit de l'ARN en extension. L'interaction entre le domaine 4 et le  $\beta$  flap est déstabilisée (Kulbachinskiy and Mustaev, 2006); cela induit la séparation de ces deux domaines, et par conséquent la liaison entre  $\sigma_4$  et l'élément -35 du promoteur est déstabilisée. C'est la première étape de la dissociation du facteur sigma de l'ARNP. Ceci permet à l'ARNP de se séparer du promoteur et d'entrer en phase d'élongation. Mais au cours de début de l'élongation le facteur sigma peut être retenu par le core de l'ARNP à la suite des interactions entre  $\sigma_2$  et les hélices de  $\beta'$  clamp. Des douzaines de bases restent rattachées en aval du site de début de transcription (Brodolin et al., 2004; Kapanidis et al., 2005; Mukhopadhyay et al., 2001). Le facteur sigma peut reconnaître des séquences semblables aux éléments -10 et -35, cette reconnaissance induit une pause transcriptionnelle (Perdue and Roberts, 2011). Les résultats des essais de Chromatin immunoprécipitation (ChIP) montrent une dissociation stochastique du facteur sigma au cours de l'élongation *in vivo* (Mooney et al., 2009; Raffaella et al., 2005; Reppas et al., 2006).

La vitesse d'élongation de la transcription par l'ARNP d'*E. coli* n'est pas uniforme et la synthèse de l'ARN est caractérisée par des pauses, dont certaines peuvent être brèves et résolues spontanément, tandis que d'autres peuvent induire un retour en arrière du TEC qui peut être restauré par les facteurs GreA/B. La vitesse d'élongation et la pause sont déterminées par la séquence du brin à transcrire et par la structure de l'ARN (stem-loops) (Washburn and Gottesman, 2015). Un certain nombre de promoteurs d'*E. coli* présentent des pauses  $\sigma^{70}$ -dépendantes, mais leur signification physiologique est toujours peu claire (Nickels et al., 2004; Perdue and Roberts, 2011).

Le complexe d'élongation (TEC) est caractérisé par une haute stabilité. Pour assurer la processivité de l'ARNP, il doit rester attaché à l'ADN et à l'ARN au cours de l'élongation dont la vitesse de transcription est comprise entre 10 et 35 nt/s *in vitro* et entre 50 et 100 nt/s *in vivo* (Pupov et al., 2014; Uptain et al., 1997).

Le taux d'élongation et la pause impliquent au moins deux composants du centre catalytique de l'ARNP qui sont bridge helix (BH) et trigger loop (TL). L'élongation se fait en deux étapes. D'abord, le TL se plie en réponse à l'arrivée de NTP, une réaction nucléophile se produit entre le groupement 3'-OH du brin d'ARN et le  $\alpha$ -phosphate du NTP entrant, formant une liaison phosphodiester. Celle-ci est suivie de la sortie du pyrophosphate. Une fois la liaison phosphodiester formée, il y a translocation du TEC d'une paire de base le long de l'ADN afin de positionner la nouvelle extrémité 3'-OH du brin d'ARN en position  $i$  et permettre l'insertion d'un nouveau NTP au site  $i+1$ . Cette translocation se ferait par l'intermédiaire d'un changement de conformation du domaine bridge helix (droite  $\leftrightarrow$  coudée) qui dirigerait l'extrémité 3'-OH du transcrit vers le site  $i$  et par un changement de conformation de trigger loop à trigger helix qui favoriserait l'ouverture des pinces aval de l'ARNP (Vassylyev et al., 2007).

Les structures du TEC, lors des différentes étapes de la translocation et de la catalyse, (Vassylyev et al., 2007; Wang et al., 2006) ont révélé des orientations multiples de 3'-ARN avec un changement local des régions entourant l'hybride de l'ADN/ARN et l'ADN aval double brin. Ces régions incluent les éléments switch, fork loop, trigger loop, lid, rudder et le domaine  $\beta'$  clamp qui ferme le canal du site actif autour des acides nucléiques (Masahiko Imashimizu et al., 2014). Le domaine  $\beta'$  clamp interagit directement avec l'ADN aval et avec l'hybride d'ADN/ARN à l'intérieur du canal principal (Vassylyev et al., 2007). Ces interactions avec l'ADN peuvent favoriser un état plus fermé. Les mutations dans plusieurs éléments  $\beta'$  clamp qui interagissent avec l'hybride ADN/ARN et l'ADN aval affectent la stabilité du complexe d'élongation (Vassylyev, 2009).

Les domaines jaw et lobe accueillent 13 bps de l'ADN aval et 9 pb de l'hybride ADN/ARN dans le canal principal proche du site actif. Le transcrit de l'ARN en extension se sépare de l'ADN continu dans le canal de sortie de l'ARN. L'accès au site actif par le canal principal étant bloqué, il est probable que le canal secondaire largement ouvert soit le point d'entrée du substrat majeur (Vassilyev, 2009).

La vitesse de translocation et la direction du complexe d'élongation sont aussi influencées par les facteurs de transcription NusG et NusA qui suppriment ou augmentent respectivement la pause. UvrD peut pousser TEC en arrière et Mfd peut le pousser en avant dans le cadre du processus de réparation couplé à la transcription. Les protéines GreA/B peuvent supprimer le retour en arrière du TEC en enlevant l'ARN extrudé et en reconstituant le 3'-ARN dans le centre actif du TEC. Le retour en arrière du TEC est supprimé quand celui-ci est associé à la traduction de l'ARN (Masahiko Imashimizu et al., 2014; Proshkin et al., 2010).

## **C.IV) Terminaison**

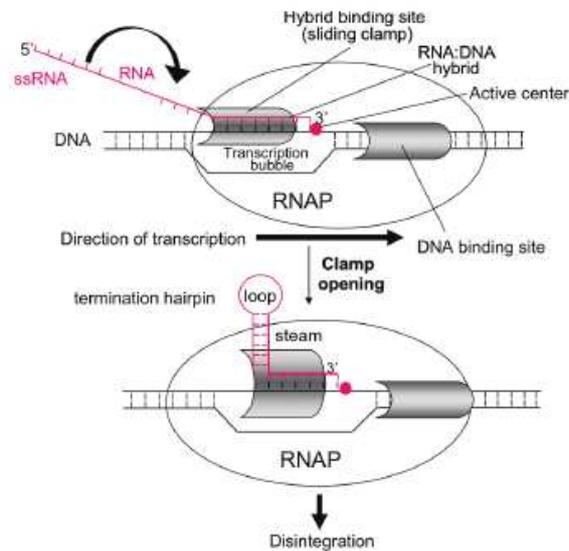
La terminaison de la transcription est régulée par deux signaux, soit par un signal de terminaison intrinsèque qui conduit à la formation d'un ARN en épingle à cheveux, soit par l'intervention de protéines régulatrices de terminaison telles que le facteur Rho.

### **C.IV.1 Terminaison intrinsèque**

La terminaison intrinsèque se produit quand le TEC arrive au niveau d'une séquence palindromique riche en GC suivie d'une répétition des résidus A. Cela conduit à la formation d'une structure en forme d'épingle à cheveux dans la chaîne d'ARN naissante. La formation de cette boucle induit l'arrêt de la synthèse de l'ARN et dissocie le TEC au 7<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> U, car l'hybride rU/dA est peu stable. La terminaison intrinsèque dépend de la coordination entre la formation complète de la boucle et la terminaison de la transcription par l'ARNP. La taille de la boucle, sa séquence et sa longueur affectent l'efficacité de la terminaison (Washburn and Gottesman, 2015) (**Figure 16**).

Les domaines Bridge helix et trigger loop de la sous-unité  $\beta'$  jouent un rôle dans la terminaison intrinsèque. Ces domaines qui bordent le site actif, ont un rôle dans la catalyse et la translocation. Des mutations dans ces deux domaines affectent la fidélité de l'ARNP et la translocation ainsi que la terminaison intrinsèque. La mutation F773V dans le domaine Bridge helix supprime la terminaison intrinsèque du  $\beta'$ tR2 (Nedialkov et al., 2013). Les domaines  $\beta$  flap,  $\beta'$  zipper et zinc finger qui forment les domaines flexibles du canal secondaire, pourraient

jouer un rôle dans l' étape d'initiation de la formation de la boucle et sa stabilisation au cours de la terminaison (Epshtein et al., 2007; Vassylyev, 2009; Washburn and Gottesman, 2015).

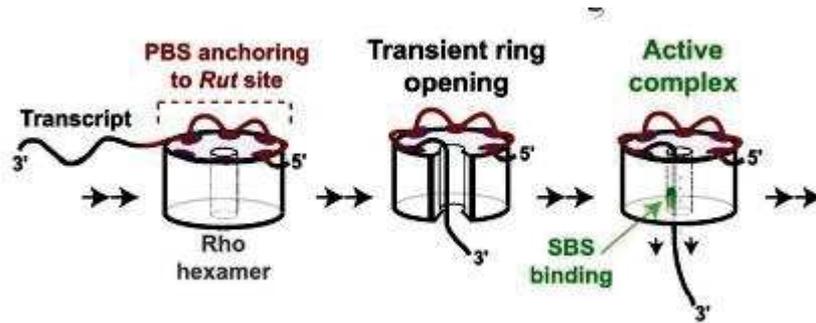


**Figure 16.** Modèle de terminaison intrinsèque (Washburn and Gottesman, 2015)

#### C.IV.2 Terminaison dépendante du facteur Rho

Le facteur de terminaison de la transcription Rho est une protéine essentielle chez *E. coli*. Environ 20% des séquences de terminaison identifiées chez *E. coli* sont dépendantes du facteur Rho (Peters et al., 2009). Rho est fortement conservé et presque omniprésent dans les bactéries (Opperman and Richardson, 1994). Rho qui a des activités ATPase et hélicase, est une protéine hexamérique en forme d'anneau ouvert (**Figure 17**) (Skordalakes and Berger, 2003).

Le facteur Rho se lie avec une haute affinité à l'ARN au niveau du site riche en C et pauvre en G. Il est appelé site d'utilisation de Rho (*rut*). Cette liaison stimule l'hydrolyse de l'ATP qui va fournir l'énergie nécessaire à la translocation dans le sens 5'→3' du facteur Rho, le long de l'ARN, jusqu'à ce qu'il rencontre l'ARNP sur un site de pause. Au niveau de ce site, le facteur Rho, par son activité hélicase, déroule l'hybride ADN/ARN et libère l'ARN du complexe d'élongation. La terminaison Rho-dépendante nécessite in vivo d'autres co-facteurs qui affectent le taux d'élongation et spécifient les sites de terminaison de la transcription. Parmi eux, on trouve NusA, NusG, ppGpp et DksA.



**Figure 17.** Représentation du mouvement du facteur Rho: (PBS) primary binding site (SBS) secondary binding site (Washburn and Gottesman, 2015).

## C.V) Rôle du couple DksA/ppGpp dans la régulation de la transcription

En dehors des facteurs sigma qui interagissent avec l'ARNP et sont indispensables à l'initiation de la transcription, d'autres protéines interviennent et affectent les différentes étapes du cycle de transcription. Parmi ces protéines, NusA/NusG interagissent avec l'ARNP, participent à la terminaison et augmentent le taux d'élongation. Les facteurs GreA et GreB qui sont des facteurs d'élongation, interagissent directement avec l'ARNP et favorisent la processivité de la transcription. Parmi les facteurs qui s'associent avec l'ARNP se trouvent aussi DksA et ppGpp.

### C.V.1 DksA

DksA est un facteur de transcription de 17 kDa. DksA et GreA/B appartiennent à une famille de protéines coiled-coil qui se fixent dans le canal secondaire de l'ARNP. Malgré ses ressemblances structurelles avec GreA/B, DksA ne peut pas induire le clivage de l'ARN au cours du retour en arrière (backtracking) de l'ARNP (Washburn and Gottesman, 2015).

La différence entre DksA et GreA/B réside au niveau de quelques résidus, à l'extrémité de la boucle coiled-coil, qui contactent le site actif de l'ARNP (Lee et al., 2012). L'analyse microray indique que plusieurs gènes sont régulés de la même façon par DksA et GreA. Mais DksA et GreA ont un rôle inverse.

DksA contrôle la transcription des gènes associés aux réponses à divers stress : manque d'acides aminés, de carbone et de fer ou stress oxydatif. Des études mutationnelles in vivo montrent que DksA est impliqué dans la protection des cellules contre les UV et autres altérations de l'ADN qui inhibent l'élongation de la transcription (Trautinger et al., 2005). DksA empêche l'arrêt de la réplication dans les cellules carencées en acides aminés (Tehranchi et al., 2010) car il est impliqué dans la prévention des conflits entre la réplication et la

transcription. Il a été suggéré que DksA empêche les clashes entre le TEC et le réplisome probablement en déstabilisant le complexe d'élongation (Brennan et al., 1987; Lowery-Goldhammer and Richardson, 1974) ou en inhibant le retour en arrière de l'ARNP. Une autre interprétation suggère que DksA enlève le TEC en avant du réplisome (Washburn and Gottesman, 2015).

Mais d'autres données *in vitro* (Roghianian et al., 2015) suggèrent que l'on ne peut pas directement expliquer la capacité de DksA à empêcher l'interférence entre l'élongation et la réplication, soit par la prévention du retour en arrière de l'ARNP, soit par la suppression de la pause de transcription, soit par la déstabilisation du complexe d'élongation. La principale découverte de cette étude montre que DksA/ppGpp augmentent la fidélité de la synthèse de l'ARN en ralentissant l'incorporation de nucléotides erronés par l'ARNP. DksA agit aux alentours du centre actif et probablement en collaboration avec Trigger Loop (Lee et al., 2012) qui est le déterminant majeur de la sélection des NTPs (Yuzenkova et al., 2010). Des études mutationnelles soit par substitution des résidus au niveau de la zone d'interaction de Trigger Loop, soit par délétion de la boucle de Trigger, ont montré que ces résidus sont nécessaires à la fonction de DksA (Lee et al., 2012).

### **C.V.2 ppGpp**

Les nucléotides guanosine, tétraphosphate et guanosine pentaphosphate (ppGpp et pppGpp ou (p)ppGpp)) sont des dérivés de GTP et GDP ; ils ont été identifiés initialement chez *E. coli* dans les cellules répondant à un signal de stress nutritif (carence en acides aminés) (Cashel, 1969; Potrykus and Cashel, 2008). Les gènes responsables de la synthèse et de la dégradation de ppGpp sont les gènes *rsh* ; ils ont été identifiés dans presque tous les génomes bactériens et dans les chloroplastes (Atkinson et al., 2011). Ces gènes encodent les protéines RSH (RelA et SpoT chez *E.coli*). Celles-ci possèdent des activités synthase et hydrolase. La protéine RelA ne possède que l'activité synthase ; elle est responsable de la synthèse de ppGpp. Lorsqu'il y a carence en acides aminés, RelA se fixe au ribosome programmé avec tRNA qui est non-chargé en acides aminés et est attaché au site ribosomal A. Ce dernier arrête la synthèse protéique et induit la synthèse de ppGpp.

La protéine SpoT a une faible activité synthase et une forte activité hydrolase qui permettent l'hydrolyse de ppGpp générant du GTP ou du GDP et du pyrophosphate. L'activité synthase entraîne l'augmentation du taux de ppGpp ; ceci provoque une réponse stringente qui inhibe rapidement la synthèse des protéines, via l'inhibition de la synthèse de l'ARNr et de l'ARNt et par conséquent inhibe la croissance des bactéries. La concentration en ppGpp est

donc inversement proportionnelle à la croissance cellulaire et au nombre de ribosomes par cellule (Potrykus and Cashel, 2008; Srivatsan and Wang, 2008). Il est admis que le déterminant de la croissance cellulaire serait ppGpp plutôt que la concentration en NTPs. ppGpp a plusieurs actions sur les cellules. Ses effets sont complexes et varient selon les organismes. La fixation de ppGpp à l'ARNP d'*E. coli* in vivo et in vitro inhibe la transcription de nombreux promoteurs requis pour la synthèse du ribosome (Haugen et al., 2008). Elle augmente la dissociation du complexe ouvert et inhibe l'initiation de la transcription des complexes qui ont une durée de vie limitée.

De nombreuses études du génome indiquent que ppGpp règle les niveaux de transcription de plusieurs centaines de gènes impliqués dans la biosynthèse macromoléculaire (Durfee et al., 2008; Traxler et al., 2008). Il affecte les activités de l'ADN primase, de la lysine decarboxylase, de IF2 et de guanylate kinase. Il règle des processus aussi divers que la réplication de l'ADN, la traduction et le métabolisme central (Denapoli et al., 2013; Kanjee et al., 2012; Kriel et al., 2012; Milon et al., 2006; Rymer et al., 2012; Srivatsan and Wang, 2008). Il est impliqué dans la virulence de beaucoup de pathogènes (Dalebroux et al., 2010).

ppGpp se fixe à l'interface des sous-unités  $\omega$  et  $\beta'$  de l'ARNP d'*E. coli* (Zuo et al., 2013). Ce site de liaison se situe à 25 Å du site actif de l'ARNP et du fait de son éloignement, son effet est allostérique sur l'initiation de la transcription (Ross et al., 2013).

Le site de liaison identifié chez *T. thermophilus* (Artsimovitch et al., 2004) est différent de celui d'*E. coli*. Cette différence pourrait s'expliquer par la divergence de leur séquence dans la partie N terminal de la sous-unité  $\omega$  et de la sous unité  $\beta'$  (Ross et al., 2013)

Chez *E. coli*, l'effet du ppGpp sur la transcription des promoteurs ribosomiques est amplifié par DksA. L'effet *in vitro* n'a pas la même efficacité qu'*in vivo*. Cela est dû à la dépendance de ppGpp à DksA *in vivo* dans le cas de la transcription des promoteurs ribosomiques et de la synthèse des acides aminés (Paul et al., 2005, 2004a).

### **C.V.3 Effet synergique de Dksa et de ppGpp**

Les mécanismes des effets synergiques de ppGpp et DksA ne sont pas bien définis. Il est suggéré que ppGpp et DksA augmentent allostériquement l'affinité de chacun à l'ARNP, en augmentant leurs effets respectifs sur l'expression des gènes (Blankschien et al., 2009; Magnusson et al., 2003). La localisation des sites de fixation de DksA et de ppGpp dans l'ARNP (Lennon et al., 2012; Mechold et al., 2013; Ross et al., 2013; Zuo et al., 2013) exclut la possibilité de leur interaction directe. ppGpp et DksA se fixent sur des sites éloignés l'un de l'autre dans l'ARNP (Perederina et al., 2004; Zuo et al., 2013). Ils réduisent la stabilité des

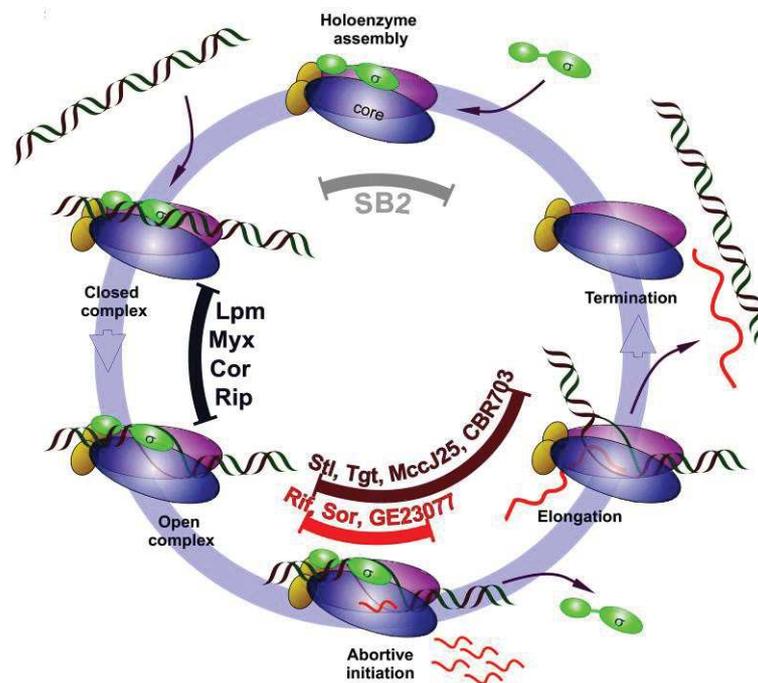
complexes du promoteur, menant ainsi à la répression ou à l'activation de la transcription selon les propriétés de promoteur ciblé (Paul et al., 2005, 2004a).

ppGpp et DksA peuvent réguler l'initiation de la transcription en agissant sur l'équilibre qui mène à la formation du complexe ouvert. Les deux modulateurs agissent différemment : ppGpp diminue l'affinité de l'ARNP au promoteur en réduisant la mobilité des sous-unités  $\beta'$  et  $\beta$ . Cela limite l'entrée de l'ADN dans le site actif et gêne l'isomérisation qui mène à la formation du complexe ouvert. DksA se fixe au niveau du canal secondaire et empêche le positionnement du nucléotide dans le site actif. Ceci a pour effet de diminuer la stabilité du complexe ouvert des promoteurs qui ont un complexe ouvert instable tel le promoteur d'ARNr (Doniselli et al., 2015).

ppGpp et DksA affectent la synthèse de l'ARNr par  $E\sigma^{70}$  et rend le core de l'ARNP disponible pour fixer des facteurs sigma alternatifs. Ce contrôle conduit à une réduction d'affinité de  $\sigma^{70}$  pour le core. Cette réduction imite l'effet d'accumulation de ppGpp sur l'activation de la transcription in vivo de  $\sigma^S$  et  $\sigma^{54}$  (Bernardo et al., 2006; Jishage et al., 2002). ppGpp et DksA régulent les sigma alternatifs directement (Costanzo et al., 2008) et différemment (Gopalkrishnan et al., 2014). Dans les situations de privation de phosphate et d'acides aminés, la transcription de  $\sigma^S$  et  $\sigma^E$  est dépendante de ppGpp, DksA est nécessaire pour  $\sigma^S$  dans les mêmes conditions, mais il n'est pas indispensable à la réponse de  $\sigma^E$  en cas de carence en phosphate (Doniselli et al., 2015; Furman et al., 2015; Gopalkrishnan et al., 2014).

## D. Inhibiteurs de l'ARN polymérase

Les études structurales par cristallographie des complexes ARNP et de plusieurs inhibiteurs ont permis de visualiser leur site de fixation et de déterminer leur mode d'action. Les inhibiteurs de transcription (**Figure 18**) sont des outils importants qui permettent d'étudier le mécanisme moléculaire de transcription. La plupart des inhibiteurs connus visent les fonctions du site actif de l'ARNP. En milieu hospitalier, deux antibiotiques la rifampicine et ses dérivés et la fidaxomicine cible l'ARNP.



**Figure 18.** Les inhibiteurs des différentes étapes du cycle de transcription de l'ARN polymérase : Lpm – lipiarmycine, Myx – myxopyronine, Cor – corallopyronine, Rip – ripostatine, Rif – rifampicine, Sor – sorangicine, Stl – streptolydigine, MccJ25 – microcline J25 (Brodolin, 2013).

## D.I) Antibiotiques ciblant l'extension de l'ARN (Figure 19)

### D.I.1 Ansamycines (rifamycines)

Les ansamycines constituent une large famille d'antibiotiques produits par les actinomycètes. Ils se caractérisent structurellement par un noyau aromatique naphthoquinone et une chaîne aliphatique fixée en position 2 et 12 sur ce noyau. Les résidus aromatiques constituent les principales différences entre les différentes variétés d'ansamycines : il peut s'agir de cycles naphthalène ou naphthaquinone comme dans la rifamycine ou la naphtomycine. D'autres variétés comprennent un cycle benzène ou benzoquinone comme la geldanamycine et de l'ansamitocine (Figure 19).

Les rifamycines ont été isolées en 1959 par Sensi (Sensi et al., 1959) à partir de la souche de *Amycolatopsis mediteraranei* (anciennement appelée *Streptomyces mediterranei* ou *Nocardia mediterranei*) (Leitich et al., 1964; Oppolzer et al., 1964).

Les positions 3 et 4 du noyau ont été largement modifiées pour obtenir des antibiotiques commerciaux semi-synthétiques (Bryskier, 1999). Plusieurs analogues de la rifampicine sont disponibles en usage thérapeutique pour traiter la tuberculose comme la rifapentine et la rifabutine (Nahid et al., 2006). La rifamixine est utilisée pour traiter les infections gastro-intestinales (Huang and DuPont, 2005) et rifalazil pour traiter les infections dues aux *chlamydia* (Rothstein et al., 2007, 2003).

La rifampicine a été introduite en thérapie en 1968, elle reste le médicament utilisé en première ligne contre la tuberculose et fait partie de la liste des médicaments essentiels de l'Organisation Mondiale de la Santé. La rifampicine possède une forte activité inhibitrice contre de nombreuses bactéries de type Gram positif (CMI < 0.1 µg/ml) et une faible activité contre certaines bactéries de type Gram négatif. Elle a une activité sur les biofilms de *Staphylococcus epidermis* (Villain-Guillot et al., 2007a). Mais la rifampicine générant des mutants résistants avec une fréquence de mutations spontanées de  $10^{-7}$  à  $10^{-8}$  (Sonenshein et al., 1974), son utilisation est associée à l'emploi d'autres antibiotiques. En association avec la dapsonne, l'acedapsonne et la clofazimine, elle est également employée dans la polychimiothérapie de la lèpre.

La résolution structurelle du complexe du core de l'ARNP et de la rifampicine, ainsi que les études biochimiques et génétiques, ont permis de déterminer le site de fixation de la rifampicine ainsi que le mécanisme d'inhibition de l'ARNP procaryote et les mutations qui mènent à la résistance à la rifampicine.

La résolution de la structure du complexe du core de l'ARNP de *Thermus aquaticus* et de la rifampicine (Campbell et al., 2001) ainsi que la résolution structurale du complexe de l'ARNP de *Thermus thermophilus* et de la rifapentine ou de la rifabutine (Artsimovitch et al., 2005) ont montré que la rifampicine se fixe exclusivement dans une poche de la sous-unité  $\beta$  localisée au niveau du canal principal, à une distance de 12 Å du site actif. Cette liaison implique 12 acides aminés qui sont fortement conservés parmi les bactéries.

Les mutations de ces acides aminés, à l'exception d'un seul, génèrent des phénotypes résistants à la rifampicine. Toutes les mutations conférant des résistances à la rifampicine sont localisées autour de son site de fixation, au centre de la sous-unité  $\beta$  du gène *rpoB*. Elles se situent au niveau de quatre régions : le cluster I (résidu 507 à 533 chez *E.coli*), le cluster II (résidu 563 à 572), le cluster III (résidu 684 à 690) et dans la partie N-terminale de la sous-unité  $\beta$  (résidus 143 et 146) (Campbell et al., 2001; Tupin et al., 2010b).

Les études biochimiques et la résolution de la structure cristallographique du complexe ARNP-rifampicine ont permis de proposer deux modèles pour expliquer le mécanisme d'action de la rifampicine :

-Le modèle "occlusion stérique" dans lequel la rifampicine agirait directement en bloquant la synthèse de l'ARN transcrit au-delà de 2-3 nt par occlusion du canal principal lorsque la transcription est initiée par un nucléotide triphosphate (Campbell et al., 2001; Feklistov et al., 2008; ).

-Le modèle allostérique propose une inhibition allostérique dans lequel la rifampicine interagit avec la région  $\sigma_{3,2}$  et induit une propagation d'un signal allostérique, sur une distance de 19 Å, du site de liaison de la rifampicine vers le centre actif de l'ARNP amenant la dissociation de l'ion  $Mg^{2+}$  du centre actif (Artsimovitch et al., 2005). Cette dissociation diminue l'activité catalytique du site actif menant à la déstabilisation et à la dissociation des transcrits courts d'ARN (Artsimovitch et al., 2005; Feklistov et al., 2008).

La résolution de la structure a révélé également l'interaction de la région  $\sigma_{3,2}$  avec le noyau naphtoquinone de la rifampicine. La délétion de la région  $\sigma_{3,2}$  rend l'ARNP résistante à la rifampicine (Artsimovitch et al., 2005) ; cela montre que le facteur sigma peut moduler la sensibilité de l'ARNP à la rifampicine.

Ces deux modèles conduisent à des hypothèses différentes. Bien que le modèle allostérique ait été contesté (Feklistov et al., 2008), les deux modèles ne s'excluent cependant pas mutuellement.

Les mutations de l'ARNP n'expliquent pas à elles seules les résistances observées chez les différentes bactéries ciblées par la rifampicine. Les bactéries utilisent une variété de

mécanismes pour contrer les actions des antibiotiques. La résistance ou la tolérance à la rifampicine est un exemple parfait de cette diversité. Les différents mécanismes de résistance à la rifampicine sont rapportés dans l'**article n°1** (Tupin et al., 2010b).

### **D.I.2 Sorangicine**

La sorangicine (Sor) isolée en 1985 par Jansen est un antibiotique de la famille des macrolides polyesters. Elle est produite sous deux formes structurales : sorangicine A et sorangicine B par la souche *Myxobacterium Sorangium cellulosum*. La sorangicine possède un large spectre d'action. Elle est principalement active contre les bactéries de type Gram-positif, y compris les mycobactéries, avec des valeurs de CMI entre 0,01 et 0,3 µg/mL. Mais elle a une faible activité contre les bactéries à Gram-négatif (CMI 3~25µg/mL). Cet antibiotique ne présente pas d'activité inhibitrice sur les ARNPs des eucaryotes (Irschik et al., 1985).

La synthèse totale de la molécule a été réalisée en 2009 (Smith et al., 2009) et une centaine d'analogues de la sorangicine ont été obtenus par semi-synthèse. Six d'entre eux possèdent une plus forte activité contre *S. aureus* avec une CMI très basse, mais leur activité ne diminue que faiblement sur l'ARNP d'*E. coli* (Jansen et al., 1990; Smith et al., 2009).

La co-structure de l'ARNP de *Thermus aquaticus* et de la sorangicine résolue à 3.3 Å (Campbell et al., 2005) a montré que cette molécule occupe la même poche de liaison que la rifampicine au niveau de la sous-unité β de l'ARNP, avec un chevauchement presque complet. Tous les résidus qui interagissent avec la rifampicine interagissent également avec la sorangicine. Bien que la sorangicine et la rifampicine aient des structures chimiques distinctes, ces deux molécules ont le même mécanisme d'action : elles bloquent la synthèse des transcrits courts d'ARN au-delà de 2-3 nt par occlusion du canal principal (Campbell et al., 2005).

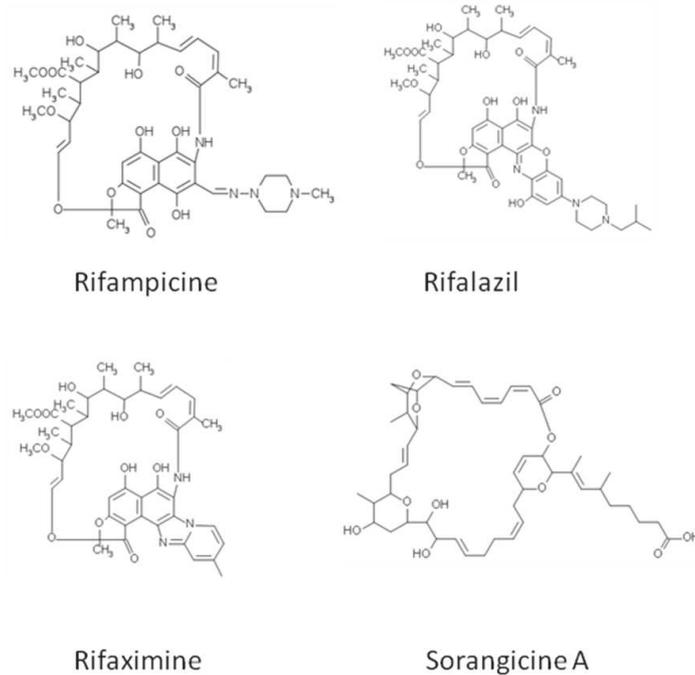
Les approches génétiques indiquent des résistances croisées à la rifampicine et à la sorangicine. Selon l'analyse structurale, les mutants résistants sont répartis en trois classes (Campbell et al., 2005).

Classe I : la plupart des mutants résistants à la rifampicine (Rif<sup>R</sup>) sont également résistants à la sorangicine (Sor<sup>R</sup>) avec un niveau de résistance proche (Rif<sup>R</sup> / Sor<sup>R</sup>).

Classe II : Certaines mutations conférant une forte résistance à la rifampicine ont une faible ou résistance nulle à la sorangicine (Rif<sup>R</sup> / Sor<sup>S</sup>).

Classe III : Deux substitutions des résidus de la sous unité β Gln (513/393) Arg et Ser (574/454) Phe chez (*Ec/Taq*) confèrent une faible résistance à la rifampicine et une forte résistance à la sorangicine (Rif<sup>S</sup> / Sor<sup>R</sup>).

Ces différences de résistance pourraient être dues à la flexibilité conformationnelle intrinsèque de la sorangicine par rapport à la rifampicine lui permettant de s'adapter plus facilement aux changements structuraux du site de liaison de la rifampicine chez les bactéries résistantes. Ceci permet de suggérer des modes d'interaction avec le site de fixation différents selon les deux antibiotiques (Campbell et al., 2005). La sorangicine serait un candidat prometteur pour le traitement de pathogènes résistants à la rifampicine.



**Figure 19.** Structure chimique des inhibiteurs ciblant l'extension de l'ARN

## D.II) Antibiotiques ciblant le site catalytique de l'ARN polymérase (Figure 21)

### D.II.1 Streptolydigin

La streptolydigin est également connue sous le nom de portamycine. C'est un antibiotique du groupe des acyltétramiques produit par *Streptomyces lydicus* et isolé en 1955 (Lewis et al., 1955). Elle possède un large spectre d'activités biologiques (Crum et al., 1955; Deboer et al., 1955). La streptolydigin est principalement active contre les bactéries à Gram-positif comme *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* et *Corynebacterium* (CMI de 0.19 à 3.12 µg /ml) (Deboer et al., 1955; Siddhikol et al., 1969). Les bactéries à Gram négatif sont résistantes en raison de la faible perméabilité de leur membrane.

Le groupe des gènes impliqués dans la biosynthèse de la streptolydigue chez *S. lydicus* a été caractérisé et quelques dérivés bioactifs de la streptolydigue ont été produits par la biosynthèse combinatoire (Olano et al., 2009; Pronin et al., 2011). La streptolydigue inhibe les étapes de l'initiation, de l'élongation et de la pyrophosphorolyse (Cassani et al., 1971; McClure and Cech, 1978; Siddhikol et al., 1969; Temiakov et al., 2005). En revanche, elle n'a aucun effet sur les ARNPs des eucaryotes (Plevani et al., 1975).

La structure de l'holoenzyme de l'ARNP de *Thermus thermophilus* et de la streptolydigue (Temiakov et al., 2005; Tuske et al., 2005) a révélé que le site de fixation est localisé à 20 Å du site actif de l'ARNP et interagit avec trois domaines structuraux : la poche de streptolydigue dans la sous unité  $\beta$  (Heisler et al., 1993), le domaine bridge helix et le domaine trigger loop de la sous unité  $\beta'$  (Tuske et al., 2005). Le positionnement de la streptolydigue n'interfère directement ni avec les NTPs, ni avec la formation de la liaison phosphodiester. Il a été suggéré que la streptolydigue bloque le cycle d'addition des nucléotides soit en interférant avec le cycle d'alternance conformationnel des domaines bridge helix et trigger loop (Temiakov et al., 2005; Tuske et al., 2005; Vassylyev et al., 2007), soit en bloquant le transfert des NTPs du site de pré-insertion ( $i$ ) au site d'insertion ( $i+1$ ) (Kyzer et al., 2005; Temiakov et al., 2005).

Une autre étude (Zorov et al., 2014) suggère que la liaison de la streptolydigue à l'ARNP dépend strictement de l'ion magnésium non catalytique qui est chélaté probablement par l'aspartate ( $\beta'$  D792) du bridge helix. Les substitutions de cet aspartate peuvent expliquer les différentes sensibilités de l'ARNP à la streptolydigue chez *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus* et chez *E.coli*. Ceci indiquerait le rôle de l'ion magnésium non catalytique dans le fonctionnement ou l'inhibition de l'ARNP.

Les mutations conférant une résistance à la streptolydigue sont localisées dans les sous-unités  $\beta$  et  $\beta'$  (Sánchez-Hidalgo et al., 2010; Severinov et al., 1993). En particulier les substitutions des deux résidus F485L et E486D (545, 546 chez *E.coli*) situés au niveau de la poche de liaison de la streptolydigue dans la sous-unité  $\beta$  se révèlent être importants dans la résistance à la streptolydigue chez *S. lydicus*.

La streptolydigue montre une résistance croisée avec streptovaricine et rifampine (Campbell et al., 2001), mais ne présente aucune résistance avec d'autres inhibiteurs de l'ARNP, comme microcine J25 (Adelman et al., 2004; Mukhopadhyay et al., 2004; Yuzenkova et al., 2002) ou sorangicine (Campbell et al., 2005) ou CBR703 (Artsimovitch et al., 2003).

### D.II.2 Microcine J25

La microcine J25 (2.100 Da) est un peptide cyclique de 21 acides aminés (Salomón and Farías, 1992) (GGAGHVPEYFVGIGTPISFYG). Elle est produite par *E. coli* contenant le plasmide pTUC 100 qui porte quatre gènes mcjABCD codant la microcine J25 lorsque la bactérie entre en phase stationnaire dans un milieu minimum (Salomón and Farías, 1992).

La microcine J25 a été isolée en 1992 à partir d'*E. coli* dans des fèces d'origine humaine (Salomón and Farías, 1992). MccJ25 est active contre quelques espèces de bactéries à Gram négatif : *E. coli*, *Salmonella* et *Shigella* avec une CMI de 0.01 à 0.2 µg/ml (Portrait et al., 1999; Sable et al., 2000; Salomón and Farías, 1992).

La structure de la microcine J25 en "lasso" comprend un segment cyclique dû à la liaison covalente entre Gly<sup>1</sup> et Glu<sup>8</sup> (-G<sup>1</sup>GAGHVPEYF<sup>10</sup>VGIGTPISFY<sup>20</sup>G-) et une queue formée par les résidus (Tyr<sup>9</sup>-Gly<sup>21</sup>) qui passe à travers le segment cyclique (Rosengren et al., 2003; Wilson et al., 2003) (**Figure 21**).

Deux types de mutations spontanées conférant une résistance à la microcine J25 ont été identifiés.

Les premières sont localisées au niveau des gènes codant les protéines d'enveloppe (FhuA, TonB, ExbB et SbmA) (Salomón and Farías, 1995, 1993). Elles indiquent que l'entrée de la molécule est dépendante de ces protéines qui sont les récepteurs de la microcine.

Les secondes sont localisées sur le gène *rpoC* codant la sous-unité β' de l'ARNP au niveau des segments conservés F, G et G', à la base du domaine trigger loop.

La microcine J25 inhibe l'initiation et l'élongation de l'ARNP, C'est le premier inhibiteur peptidique de l'ARNP *in vivo* et *in vitro* (Delgado et al., 2001; Yuzenkova et al., 2002).

La plupart des mutations résistantes à la microcine J25 ont permis de définir son site de liaison qui est localisé dans le canal secondaire. La fixation de la microcine J25 obstruerait complètement ce canal, empêchant ainsi la pénétration des nucléotides et donc inhibant la réaction de la pyrophosphorolyse au sein du site catalytique (Mukhopadhyay et al., 2004; Yuzenkova et al., 2002).

Cependant des mutants résistants à la streptolydigue au niveau de la sous unité β étaient également résistants à la microcine J25 (Yuzenkova et al., 2002). Il est possible que le site de liaison de la microcine J25 chevauche celui de la streptolydigue. Il est possible aussi que leur mécanisme d'action soit similaire malgré les différences de leur structure chimique commune (Yuzenkova et al., 2002).

### D.II.3 Série CBR703

C'est une nouvelle classe d'inhibiteurs synthétiques de l'ARNP. Ces inhibiteurs ont été isolés à l'issue du criblage à haut débit d'une large banque de composés lors d'un test sur le core et sur l'holoenzyme de l'ARNP d'*E. coli* (Artsimovitch et al., 2003). Ils inhibent l'initiation de la transcription et l'élongation avec une  $IC_{50} \sim 10 \mu M$  et semblent être spécifiques de l'ARNP bactérienne. Ils ne montrent pas d'activité sur les autres classes de polymérase d'acide nucléique bactérienne, virale ou eucaryote. Ils ont une activité sélective contre les bactéries à Gram négatif *E. coli tolC* (CMI = 12.5  $\mu g/ml$ ) et peu ou pas d'activité contre l'ARNP des bactéries à Gram positif avec une  $IC_{50} > 80 \mu M$  (Artsimovitch et al., 2003; Feng et al., 2015). Cette faible activité est due au système d'efflux spécifique de ces cellules (Darst, 2004).

Des dérivés plus actifs ont été synthétisés à partir du progéniteur CBR703 : CBR9379 ( $IC_{50} \sim 0.3 \mu M$  et CIM  $\sim 0.5 \mu M$  contre *E. coli tolC*), CBR9393 ( $IC_{50} \sim 2.5 \mu M$  et CIM  $\sim 8-16 \mu M$  contre *E. coli tolC*) et CBR64 qui est l'inhibiteur le plus actif contre *E. coli* WT.

CBR703 est actif contre les bactéries persistantes. Il réduit la population bactérienne des biofilms de *Staphylococcus epidermidis* (Villain-Guillot et al., 2007a).

Ces molécules sont particulièrement prometteuses pour un usage clinique et sont un bon modèle pour le développement d'autres antibiotiques.

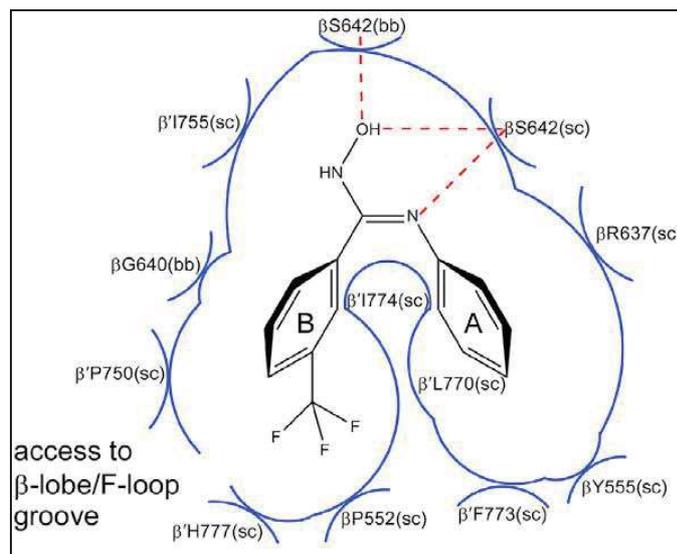
La structure de l'holoenzyme de l'ARNP d'*E. coli* et de CBR 307 (Feng et al., 2015) a révélé que l'inhibiteur CBR 307 se fixe dans une poche contenant deux sous-sites hydrophobes qui interagissent avec les deux anneaux aromatiques de CBR. L'inhibiteur s'insère dans les deux sous-sites du domaine bridge helix (ressemblant à une prise électrique) (**Figure 20**), à une distance de 30 Å du site actif à l'interface des deux sous-unités  $\beta$  et  $\beta'$  (Floop et bridge helix). Le premier sous-site s'étend du résidu L770 au I 774 et le second sous-site s'étend du résidu I774 au H777.

L'isolation de 19 mutants résistants à CBR703 à partir d'*E. coli tolC* a montré que les mutations sont organisées en clusters au niveau des gènes *rpoB* ( V550A, P552R, P560L, E562V, Q618L, R637C , S642A , D654H , T657I ) et *rpoC* (I755L, E756K, T757K, L770H, I774S) (Artsimovitch et al., 2003; Feng et al., 2015; Malinen et al., 2014). Ces mutations indiquent que CBR 703 se lie à la surface d'une cavité à la jonction du domaine  $\beta'$  bridge helix et de la sous-unité  $\beta$ . Cette localisation étant éloignée du site actif, CBR703 pourrait avoir un effet allostérique. Il a donc été proposé que l'interaction de l'antibiotique avec le domaine flexible bridge helix empêche ce domaine d'adopter la conformation requise pour l'ajout des nucléotides au niveau du site actif. (Artsimovitch et al., 2003; Darst, 2004; Malinen et al.,

2014). L'incorporation des nucléotides est réglée par l'alternance de l'ouverture et de la fermeture du site actif par le domaine trigger loop dont la stabilité est modulée par  $\beta'$  F loop. (Malinen et al., 2014). Mais CBR peut inhiber la transcription de l'ARNP  $\Delta$  trigger loop. L'action de CBR n'exige pas la présence de cette boucle. Cela suggère que l'inhibition par CBR implique des mécanismes qui sont, au moins en partie, indépendants de la conformation de trigger loop.

Les approches génétiques montrent que le site de liaison de CBR703 sur l'ARNP ne chevauche pas celui des autres inhibiteurs : rifampicine, streptoledigine, salinamide, GE23077, myxopironin, lipiarmycine. et qu'il n'y a pas de résistance croisée entre CBR703 et ces inhibiteurs (Feng et al., 2015).

Ces résultats sont importants pour le développement d'inhibiteurs CBR potentiels. La combinaison du CBR avec un autre inhibiteur de l'ARNP devrait augmenter l'efficacité thérapeutique et supprimer l'émergence de résistances spontanées (Feng et al., 2015).



**Figure 20.** Représentation schématique des contacts entre l'ARNP et l'inhibiteur CBR ( lignes rouges pointillées : liaisons H, arcs bleus : les interactions Van Der Waals) (Feng et al., 2015)

#### D.II.4 Salinamide

Salinamide A (SalA) et salinamide B (SalB) sont des bicycliques hexadepsipeptides qui ont été isolés à partir de *Streptomyces sp.* CNB-091 en 1994 (Trischman et al., 1994).

SalA est aussi produit par *Streptomyces Sp.* NRRL 21611, (Miao et al., 1997).

SalA et SalB sont actifs contre les bactéries de type Gram-positif (CMI = 25 µgml<sup>-1</sup>) et les bactéries de type Gram négatif (CMI de 25 à 50 µgml<sup>-1</sup>) et en particulier contre *Enterobacter cloacae* (CMI = 1.56 µgml<sup>-1</sup>) et *Haemophilus influenzae* (CMI = 6.25 µgml<sup>-1</sup>). Ils ne montrent pas de cytotoxicité pour les cellules des mammifères (Moore et al., 1999; Trischman et al., 1994) et ont une activité anti-inflammatoire puissante.

SalA et SalB inhibent l'ARNP des bactéries de type Gram-positif et Gram négatif (IC<sub>50</sub> = 0.2 à 0.8 µM) (Degen et al., 2014), mais n'inhibe pas les ARNPs des eucaryotes (Miao et al., 1997). La synthèse totale de la molécule a été réalisée en 2008 (Tan and Ma, 2008) et le gène cluster de la biosynthèse a été identifié en 2015 (Ray et al., 2015).

L'isolement et le séquençage des 47 mutants spontanés qui confèrent une résistance à salinamide (Degen et al., 2014), ont permis de les localiser au niveau du gène *rpoC* (résidus 690, 697, 738, 748, 758, 763, 775, 779, 780, 782, 783) et *rpoB* (résidus 569, 675, 677).

La résolution de la structure du complexe formé par l'holoenzyme de l'ARNP de *E.coli* et salinamide (Degen et al., 2014) a permis de montrer que la molécule se fixe dans le centre actif au niveau du domaine bridge helix cap qui comprend la partie N-terminale bridge helix (BH-H<sub>N</sub>), F loop et le lien des deux régions.

La structure du complexe ne montre de contacts ni avec le centre catalytique Mg<sup>2+</sup>, ni avec les résidus qui interagissent avec le brin matrice de l'ADN, ni avec le transcrit de l'ARN, ni avec les substrats NTP. Cela a permis de suggérer que salinamide inhibe allostériquement l'addition des nucléotides au cours de l'initiation de la transcription et au cours de l'élongation, par l'interaction et la stabilisation de la conformation ouverte de la partie N-terminale bridge helix (BH-H<sub>N</sub>).

Ces résultats établissent que le site de liaison de salinamide ne chevauche pas ceux des inhibiteurs de l'ARNP déjà caractérisés : Rif, Stl, CBR703, Myx et Lpm. En conséquence, Sal ne présente pas de résistance croisée avec les mutants résistants à ces autres inhibiteurs de l'ARNP et réciproquement, les mutants résistants à ces inhibiteurs ne sont pas résistants à salinamide. La co-administration de Sal et Rif ou de Sal et Myx prévient l'émergence de résistances spontanées (Degen et al., 2014).

### D.II.5 Peptide GE23077

GE23077 est un nouvel inhibiteur de l'ARNP bactérienne isolé à partir de la culture de *Actinomadura* sp (Ciciliato et al., 2004). C'est un heptapeptide cyclique (MW~ 803 Da) qui est un mélange de quatre composés A1, A2, B1 et B2 (Ciciliato et al., 2004). GE23077 inhibe l'ARNP d'*E.coli* et de *B.subtilis* avec des IC<sub>50</sub> de l'ordre de 20 nM. Il est aussi capable d'inhiber l'ARNP d'*E. coli* résistant à la rifampicine et ceci à une concentration comparable (Ciciliato et al., 2004; Sarubbi et al., 2004). Mais il n'a aucune activité sur le core de l'ADN polymérase et sur l'ARNP II des eucaryotes. En dépit de son activité in vitro sur l'ARNP, GE23077 montre une faible activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram-positif et les bactéries à Gram-négatif (CMI > 200 µg ml<sup>-1</sup>) à l'exception de *Moraxella catarrhalis* et *Streptococcus pyogenes* (CMI 4 à 8 µg ml<sup>-1</sup>) (Ciciliato et al., 2004; Sarubbi et al., 2004). Il a une faible activité contre *Neisseria gonorrhoeae* et *M. smegmatis* et une forte activité contre les plasmolyses cellulaires d'*E. coli* avec une IC<sub>50</sub> = 0.02 µM comparable à celle de la rifampicine.

Cette faible activité antibactérienne de GE23077 est très probablement liée à des limites de pénétration à travers la membrane, en raison de son caractère fortement hydrophile (Mariani et al., 2005; Sarubbi et al., 2004). Des analogues semi synthétiques de GE23077 ont été préparés dans le but de réduire ce caractère hydrophile. Les modifications de ces analogues n'ont pas été suffisantes pour augmenter leur activité antibactérienne (Mariani et al., 2005; Sarubbi et al., 2004).

GE23077 inhibe la transcription dépendante et indépendante du facteur  $\sigma$  (Mariani et al., 2005) et il inhibe l'addition des nucléotides au cours de l'initiation de la transcription mais n'affecte pas l'élongation.

Le site de fixation de GE23077 a été identifié par la caractérisation des 33 mutants résistants qui sont localisés dans la sous-unité  $\beta$  de l'ARNP d'*E. coli* (Zhang et al., 2014) avec six substitutions sur trois sites au niveau des résidus 565, 566 et 684 avec CMI > 500 µg/ml et IC<sub>50</sub> > 400 µM. L'analyse des mutants chez *Streptococcus pyogenes* portant des substitutions simples (résidus 565, 681 et 684) indique que ces substitutions correspondent à celles d'*E.coli* et confèrent la résistance à GE23077.

En conséquence, les régions comprises entre les résidus 565-566 et 681-684 constituent un déterminant essentiel pour l'inhibition de la transcription de l'ARNP par GE23077 chez les bactéries à Gram-positif et les bactéries à Gram-négatif.

Le site d'inhibition de GE est moins étendu que celui des autres inhibiteurs de l'ARNP : Rif (71 substitutions et 27 sites), Myx, Cor et Rip (28 substitutions et 19 sites), Lpm (30

substitutions et 20 sites), Stl (27 substitutions et 19 sites), CBR703 (23 substitutions et 13 sites) et MccJ25 (86 substitutions et 52 sites) (Zhang et al., 2014).

Le site d'inhibition de GE23077 correspond seulement à une partie de son site de liaison alors que le site d'inhibition de Rif et des autres inhibiteurs de l'ARNP précédemment caractérisés correspondent aux sites de liaison complets. Le site de liaison de GE comprend également des résidus des sites  $i$  et  $i+1$  du centre actif de l'ARNP qui ne peuvent pas être substitués et donc ne peuvent pas conférer la résistance à GE.

La structure de l'holoenzyme de *Thermus thermophilus* et GE23077 (Zhang et al., 2014) a permis de confirmer les résultats des analyses génétiques. A côté des mutants résistants, il y a 11 résidus additionnels dans les sites actifs  $i$  et  $i+1$  avec lesquels GE établit des interactions directes. Ces résidus supplémentaires sont invariables dans les ARNPs et ne peuvent pas être substitués et induire de résistance à GE23077.

La liaison de GE23077 au site actif de l'ARNP interfère avec l'addition des nucléotides au niveau des sites  $i$  et  $i+1$  et inhibe la première étape de fixation des NTPs au cours de l'initiation de la transcription. Les analyses de la structure du complexe RPo avec GE23077 et la rifampicine montrent que le site de liaison de GE23077 est adjacent à celui de la rifampicine, mais ils ne se chevauchent pas en grande partie. Les deux inhibiteurs peuvent se fixer simultanément dans leur site de liaison respectif, ce qui suggère que GE23077 et rifampicine peuvent être liés d'une manière covalente sous forme d'inhibiteur bipartite (Zhang et al., 2014)

Cette étude révèle que GE23077 inhibe l'ARNP à travers une nouvelle cible avec un nouveau mécanisme. La cible de GE est une cible exceptionnellement attractive et privilégiée pour la découverte de médicaments antibactériens ciblant l'ARNP.

En premier lieu, puisque la plupart des résidus du site de liaison de GE sont des résidus fonctionnellement critiques du centre actif de l'ARNP et ils ne peuvent pas être substitués sans perte d'activité. Le spectre de résistance au niveau du site de liaison de GE sera étroit en comparaison avec celui de la rifampicine.

En second lieu, puisque son site de liaison diffère de celui de la rifamycine, GE ne présentera pas de résistance croisée avec elle.

En troisième lieu, un composé antibactérien qui fonctionne à travers le site de liaison de GE, peut être lié à la rifamycine ou à la sorangicine pour construire un inhibiteur bipartite, exceptionnellement actif et puissant contre l'émergence de la résistance (Zhang et al., 2014).

### D.II.6 Tagetitoxine

La tagetitoxine est une phytotoxine produite par *Pseudomonas syringae* pv. *Tagetis*. Elle a été isolée en 1981 (Mitchell, *Physio. Plant Path.*, 1981). Elle inhibe l'ARNP des chloroplastes et des bactéries (Mathews and Durbin, 1990) ainsi que l'ARNP III des eucaryotes (Steinberg 1990). Les ARNPs des phages et les ARNPs nucléaires I et II sont résistants à la tagetitoxine (Mathews and Durbin, 1990). 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 and Durbin, 1990).

La structure du complexe formé par la tagetitoxine avec l'ARNP *Thermus thermophilus* a été résolue par cristallographie en 2005 (Vassylyev et al., 2005). Cette étude a suggéré que la tagetitoxine se lie à la base du canal secondaire près du site actif. Cette liaison inhibe la formation de la liaison phosphodiester car elle perturbe la liaison de deuxième ion catalytique  $Mg^{2+}$ . Elle perturbe également la liaison des phosphates des nucléotides au niveau du site actif en stabilisant le complexe enzymatique dans un état incompatible avec la catalyse (Vassylyev et al., 2005; Yuzenkova et al., 2013).

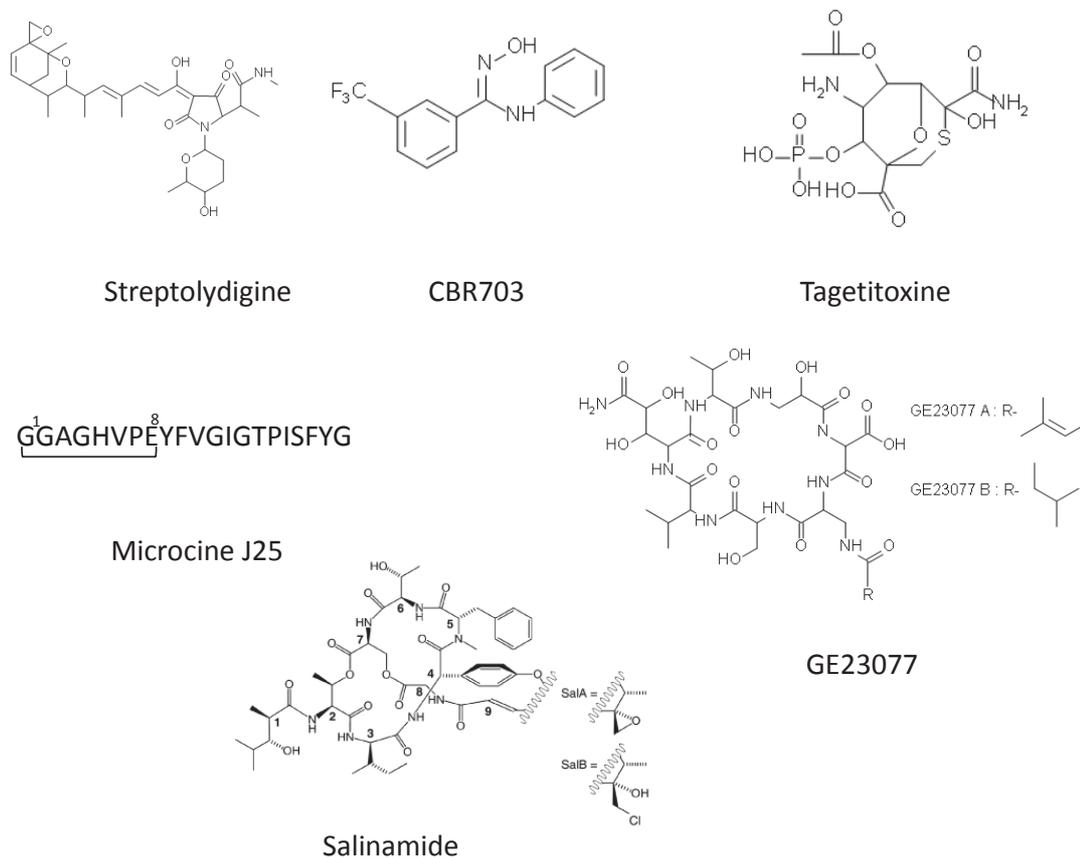
Dans une autre étude (Artsimovitch et al., 2011) réalisée par simulation de dynamique moléculaire un modèle a été proposé dans lequel la tagetitoxine a été liée au complexe d'élongation de la transcription. Dans ce modèle, la tagetitoxine interagit avec  $\beta'$  trigger loop (TL) en le stabilisant dans une conformation inactive. Cela a permis de montrer que la substitution du résidu Arg de TL confère une résistance à l'inhibiteur.

Un autre modèle a été proposé (Malinen et al., 2012) dans lequel la tagetitoxine en se liant au complexe post-translocation, induit un repliement de  $\beta'$  trigger loop et par conséquent inhibe le passage à l'étape de pré-translocation. Ces différentes étapes sont impliquées dans le cycle d'addition des nucléotides. Ce modèle a été contesté par Klyuyev (Klyuyev and Vassylyev, 2012) qui suggère que l'étude du site de fixation de la tagetitoxine et son mécanisme d'action demande d'autres résolutions de la structure du complexe et d'autres études biochimiques.

Une étude récente (Yuzenkova et al., 2013) montre que la tagetitoxine n'affecte pas la synthèse de l'ARN, n'induit pas de backward translocation, n'entre pas en compétition avec les nucléosides dans le centre actif. Ces études biochimiques indiquent que l'inhibition de la tagetitoxine dépend de la séquence à transcrire et de la stabilité intrinsèque du complexe de pré-translocation.

Cette étude suggère que la tagetitoxine augmente la stabilité de l'état de pré-translocation du complexe d'élongation et perturbe ainsi le passage de l'état de pré-

translocation à l'état de post-translocation via la stabilisation de trigger loop dans l'état plié et par conséquent inhibe le cycle d'addition des nucléotides et la synthèse de l'ARN.



**Figure 21.** Structure chimique des inhibiteurs ciblant le site catalytique de l'ARN polymérase

### D.III) Les inhibiteurs bloquant la formation du complexe ouvert (Figure 22)

#### D.III.1 Myxopyronine

Myxopyronine (Myx) est un antibiotique naturel de la classe des  $\alpha$ -pyrone (MW= 417 Da pour Myx A et 431 Da pour Myx B) produit par *Myxobacterium Myxococcus fulvus* Mf50. Deux formes de myxopyronine ont été isolées en 1983 : les myxopyronines A et B. La Myx B est plus active que la Myx A (Irschik et al., 1983). Myx a une forte activité antibactérienne contre un large spectre de bactéries à Gram-positif, y compris *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis*, et *Bacillus anthracis* (CMI 1-13  $\mu\text{g/ml}$ ). Elle a également une activité antibactérienne puissante contre quelques bactéries Gram-négatif, y compris *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Francisella tularensis* (CMI = 6.1-16  $\mu\text{g/ml}$ ) (Irschik et al., 1983; Mukhopadhyay et al., 2008; Srivastava et al., 2011).

L'absence d'activité antibactérienne contre les autres espèces Gram-négatif est due aux barrières d'assimilation cellulaire et aux systèmes d'efflux actif, comme chez *E. Coli* sauvage. La myxopyronine a une forte activité contre le mutant d'*E. coli* DH21 *tolC* (CMI < 1  $\mu\text{g/ml}$ ), Myx inhibe l'ARNP des bactéries (Gram-négatif et Gram-positif) avec  $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{M}$ , mais elle n'inhibe pas l'ARNP II des eucaryotes (Irschik et al., 1983). Myx inhibe l'ARNP au cours de l'initiation de la transcription mais n'a pas d'effet sur l'élongation. Elle inhibe la formation du RPo seulement quand elle est ajoutée avant l'ADN (Belogurov et al., 2009; Mukhopadhyay et al., 2008).

Plus de 100 analogues de Myx, plus puissants que Myx B, ont été synthétisés (Doundoulakis et al., 2004; Lira et al., 2007).

L'isolement et le séquençage des mutants résistants à la myxopyronine (Mukhopadhyay et al., 2008) ainsi que l'analyse structurale du complexe formé par l'holoenzyme de *Thermus thermophilus* et MyxA (Mukhopadhyay et al., 2008) et celui formé avec Myx B (Belogurov et al., 2009) ont permis de localiser le site de fixation de la Myx dans l'ARNP dans une poche hydrophobe formée par les éléments switch-1 et switch-2 et les segments adjacents des sous-unités  $\beta$  et  $\beta'$  ( $\beta'$  résidus 1346-1357 et  $\beta$  résidus 1270-1292 et 1318-1328) (Mukhopadhyay et al., 2008).

Deux modèles proposent le mécanisme par lequel Myx inhibe l'isomérisation de RPe vers RPo. Selon le premier modèle, Myx bloque l'ouverture du clamp empêchant l'entrée de l'ADN dans le site actif de la positions -11 à +15 (Mukhopadhyay et al., 2008). Selon le

deuxième modèle, Myx empêche l'interaction de la région switch-2 et du brin matrice et par conséquent empêche le positionnement de la partie avale de l'ADN et la propagation de la fusion de l'ADN vers le site actif (Belogurov et al., 2009).

Myx ne présente aucune résistance croisée ni avec la rifampine, ni avec d'autres molécules inhibitrices de l'ARNP (CBR703, MccJ25, GE23077, streptolydigin, sorangicin et salinamide) se fixant sur des sites autres que les régions switch. Mais elle présente une résistance croisée avec les antibiotiques qui ciblent la région  $\beta'$  switch 2 (corallopyronine et ripostatine).

Quand elle est co-administrée avec rifampine, Myx montre une activité antibactérienne supérieure. Myx pourrait être un candidat prometteur contre divers pathogènes (Srivastava et al., 2011).

### **D.III.2 Corallopyronine**

Corallopyronine est un antibiotique possédant un groupement  $\alpha$  pyrone (MW = 542 Da) produit par myxobacterium *Coralloccoccus coralloides*. Elle a été isolée pour la première fois en 1985 (Irschik et al., 1985). Il en existe trois formes : corallopyronine A, B et C. Elle est structurellement proche des myxopyronines, mais elle en diffère par la possession d'une extension de chaînes de sept carbones. La corallopyronine est essentiellement active contre les bactéries à Gram-positif avec des valeurs de CMI comprise entre 0.1 à 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  et à forte concentration contre les bactéries à Gram-négatif (CMI > 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) (Irschik et al., 1985).

Corallopyronine inhibe l'ARNP bactérienne (IC<sub>50</sub> ~ 4 $\mu\text{M}$ ), mais elle n'a pas d'effet sur l'ARNP des eucaryotes (Irschik et al., 1985; Mukhopadhyay et al., 2008).

Les études biochimiques ont montré que la corallopyronine agit essentiellement comme la Myxopyronine et inhibe la formation du complexe ouvert au cours de l'initiation de la transcription (Mukhopadhyay et al., 2008).

L'analyse des mutants résistants à la corallopyronine révèle que son site de liaison chevauche celui de la myxopyronine qui se trouve au niveau de la région  $\beta'$  switch-1 et switch-2. La substitution du résidu 1326 de la sous-unité  $\beta$  qui interagit avec l'extension de la chaîne à sept carbones, confère une forte résistance à la corallopyronine mais pas à la myxopyronine (Mukhopadhyay et al., 2008).

Aucune résistance croisée avec la rifampicine (O'Neill et al., 2000) n'a été observée, mais la corallopyronine présente une forte résistance croisée avec Myx et avec la ripostatine (Mukhopadhyay et al., 2008).

Le groupe de gènes impliqués dans la biosynthèse de la corallopyronine composé de polyketides synthétases (PKSs) et de peptides synthétases non-ribosomales (NRPSs) a été caractérisé et la synthèse totale de la molécule a été réalisée (Erol et al., 2010).

Cependant en raison de sa faible activité et de la haute fréquence des mutations spontanées observées chez *S. aureus*, on ne la considère pas comme un médicament prometteur (Mariner et al., 2011).

### D.III.3 Ripostatine

La ripostatine A et la ripostatine B (MW ~ 496 Da) sont des macrocyclo-lactone, produits par la souche *Sorangium cellulosum* So ce377 (Irschik et al., 1995). La ripostatine ne montre aucune similitude structurelle avec Myx et Cor, en dehors d'une similitude générale de la taille et du caractère hydrophobe. La ripostatine est active contre les bactéries à Gram-positif avec des valeurs de CMI ~ 1 µg ml<sup>-1</sup> chez *S. aureus* (Irschik et al., 1995), *E. faecium* et *Clostridium difficile* (Srivastava et al., 2011) et contre une seule bactérie à Gram-négatif *Moraxella catarrhalis*. Ceci est dû à la faible perméabilité de la membrane extérieure des bactéries Gram négatif. Mais la ripostatine a montré une bonne activité contre *E. coli* DH21f2tolC (Srivastava et al., 2011).

La ripostatine inhibe in vitro la transcription de l'ARNP d'*E. coli* avec IC<sub>50</sub> ~ 0.8 µM, mais elle n'inhibe pas l'ARNP II des eucaryotes (Irschik et al., 1995; Mukhopadhyay et al., 2008; Srivastava et al., 2011).

L'activité antibactérienne de la ripostatine est approximativement identique à celle de Myx, mais elle a un spectre plus étroit et a généralement une activité plus faible (Mukhopadhyay et al., 2008). La synthèse complète de la ripostatine A et B et celle de leurs analogues ont été réalisées (Glaus and Altmann, 2012; Tang et al., 2014). Ces analogues sont importants pour leur activité et leur stabilité.

Les résistances croisées à la rifampicine et la fréquence des résistances spontanées à la ripostatine sont essentiellement identiques à ceux de Myx.

Toutes les substitutions conférant une forte résistance à la ripostatine confèrent également une résistance à la myxopyronine et à la corallopyronine.

Ces résultats suggèrent que la ripostatine a le même mécanisme d'action que la myxopyronine et que la corallopyronine. Ces inhibiteurs interagissent avec la même cible et bloquent la formation du complexe ouvert.

La ripostatine empêche l'interaction de l'ARNP avec le promoteur (-11 à +15 ) et bloque l'ouverture du domaine B' « clamp » de l'ARNP (Mukhopadhyay et al., 2008; Srivastava et al., 2011).

#### D.III.4 Lipiarmycine

La lipiarmycine ( MW ~ 1058 Da ) est aussi connue sous les noms de *fidaxomicin* (Sullivan and Spooner, 2010), *clostomicine* (Omura, 1986), *tiacumicine* (Swanson et al., 1991; Theriault et al., 1987), *OPT-80* et *PAR-101*. C'est un antibiotique de type lactone macrocyclique qui a été isolé en 1975 (Coronelli et al., 1975; Parenti et al., 1975; Sergio et al., 1975). Il est produit par plusieurs micro-organismes : *Actinoplanes deccanensis*, *Micromonospora echinospora* et par *Dactylosporangium aurantiacum*.

La lipiarmycine est active contre un large spectre de bactéries à Gram-positif (Coronelli et al., 1975) , et en particulier contre les souches de *Clostridium difficile* (CMI = 0.012 µg/ml ) (Swanson et al., 1991; Theriault et al., 1987), de *Bacillus subtilis* et de *Enterococcus faecalis* (CMI de 8 à 16 µg/ml) (Gualtieri et al., 2009). Elle a une forte activité contre les mutants multirésistants de *Mycobacterium tuberculosis* (CMI de < 0.1 µg ml<sup>-1</sup>) (Kurabachew et al., 2008), mais elle a une faible activité contre les bactéries à gram-négatif ( CMI > 11 µg/ml) (Coronelli et al., 1975; Srivastava et al., 2011).

La fréquence des mutations spontanées résistantes à la lipiarmycine chez *S aureus* est de  $3 \cdot 10^{-8}$  ; elle est comparable ou légèrement inférieure à la fréquence des mutations spontanées résistantes à la rifampicine qui est de  $5 \cdot 10^{-8}$  (Kurabachew et al., 2008; Srivastava et al., 2011).

La lipiarmycine ne montre pas de résistance croisée avec un certain nombre d'antibiotiques connus tels la rifampine, la pénicilline, la streptomycine, la tétracycline, la novobiocine, la néomycine, l'érythromycine, le chloramphénicol, la céphaloridine, la streptothricine, la bicatracine et l'oléandomycine (Coronelli et al., 1975) ainsi qu'avec l'isoniazide et la moxifloxacine (Kurabachew et al., 2008).

La lipiarmycine a été approuvée par la FDA pour le traitement de *Clostridium difficile* en 2011 sous le nom Difidid<sup>®</sup>. Elle présente un faible risque de toxicité extradiigestive avec un faible impact sur la flore intestinale et un profil de tolérance excellent (Artsimovitch et al., 2012; Srivastava et al., 2011).

La lipiarmycine inhibe l'initiation de la transcription de l'ARNP de *Staphylococcus aureus* avec une IC<sub>50</sub> = 0.4 µM et celle de *E. coli* avec une IC<sub>50</sub> = 6 µM; mais elle n'a pas d'effet sur l'ARNP des eucaryotes (Sonenshein and Alexander, 1979; Tupin et al., 2010a).

Les études biochimiques indiquent que la Lpm inhibe l'isomérisation du complexe RPc vers le complexe RPo ; mais elle n'a pas d'effet quand elle est ajoutée après la formation du RPo. La cible de la Lpm a été identifiée par la localisation des mutants spontanés résistants à la Lpm chez *B. subtilis* (Sonenshein et al., 1977 guialleteri), chez *M. tuberculosis* (Kurabachew et al., 2008) et *Enterococcus faecalis* (Gualtieri et al., 2009). Ces substitutions sont localisées dans la partie N-terminale de la sous-unité  $\beta'$  (R99, P251, R337 chez *E. coli*) et dans la partie C-terminale de la sous-unité  $\beta$  (Q 1256 chez *E. coli*) (André et al., 2004; Gualtieri et al., 2006b; Kurabachew et al., 2008). La Lpm se fixe en amont du canal principal à proximité du canal de sortie de l'ARN et cible les différents éléments du domaine mobile clamp de la sous unité  $\beta'$  : Zn-finger, lid, et switch-2 et celui de la sous unité  $\beta$  : switch-3 (Tupin et al., 2010a).

Le site de fixation de la Lpm chevauche partiellement celui de la myxopyronine au niveau de l'élément switch 2; mais il n'y a pas de résistance croisée entre Lpm et Myx, entre Lpm et Cor, entre Lpm et Rip et vice versa (Srivastava et al., 2011). Les mécanismes d'inhibition de la Lpm et de la Myx sont différents, la Lpm agit avant la Myx au cours de la formation du complexe RPo (Brodolin, 2011; Tupin et al., 2010a).

La lipiarmycine inhibe la transcription dépendante du facteur sigma car elle est plus active sur l'holoenzyme que sur le core de l'ARNP (Tupin et al., 2010a).

En 2006, notre équipe a déterminé une mutation conférant une résistance à la lipiarmycine chez *B. subtilis*. Cette résistance est due à la substitution d'une arginine par une leucine au niveau du résidu 326 (R326L) de la sous-unité  $\beta'$ . Cette mutation est localisée au niveau du canal principal, à proximité de la région 3.2, sur la face opposée du site de liaison de la rifampicine (Gualtieri et al., 2006b).

La délétion des résidus 513-519 de la région  $\sigma_{3.2}$  change la sensibilité de l'ARNP à la Lpm (Morichaud et al., 2016; Tupin et al., 2010a). Il a été observé également que la Lpm inhibe la transcription précoce du bactériophage SPO1 qui est dépendante du facteur  $\sigma^A$  de son hôte *B. subtilis*. Mais Lpm n'a aucun effet sur les transcriptions moyennes et tardives qui sont, elles, dépendantes des polypeptides gp28, gp33 et gp34 codés par le génome du phage et qui ont perdu la région 3.2 (Osburne and Sonenshein, 1980).

Ces résultats montrent pour la première fois une modulation due à l'effet d'un inhibiteur sur la transcription dépendante du facteur  $\sigma$  associé à l'ARNP.

Le groupe de gènes, impliqué dans la biosynthèse de la Lpm chez *D. aurantiacum* et *A. deccanensis*, a été identifié et caractérisé. Celui-ci présente de fortes similarités de séquence chez ces deux espèces (Xiao et al., 2011). Cela a permis la synthèse complète de la fidaxomicine (Glaus and Altmann, 2015; Kaufmann et al., 2015). Les caractéristiques clés de

la synthèse permettront un accès rapide à la synthèse d'analogues plus efficaces contre les bactéries pathogènes.

### D.III.5 Ureidothiophène

Ureidothiophène a été identifié pour la première fois lors du criblage d'une banque de composés chimiques commerciaux en utilisant l'ARNP de *S. aureus* (Arhin et al., 2006) et également au cours d'un criblage virtuel ciblant la région switch de l'ARNP basé sur le modèle de l'ARNP d'*E. coli* à 3D-pharmacophore (Fruth et al., 2014).

La molécule a une forte activité sur l'ARNP avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 1 µM, mais elle possède un spectre d'activités antimicrobiennes très étroit qui se limite à certaines souches de *S. aureus*. Elle présente une bonne activité antibactérienne contre de *S. aureus* ATCC 13709 et *S. epidermidis* avec une CMI comprise entre 1 et 16 µg ml<sup>-1</sup>, mais elle n'a pas d'activité contre les bactéries à Gram-négatif. Par contre, elle reste active contre les souches de *S. aureus* et *Escherichia coli TolC* résistantes à la rifampicine (MIC 12.5–50 µg ml<sup>-1</sup>) (Arhin et al., 2006; Fruth et al., 2014).

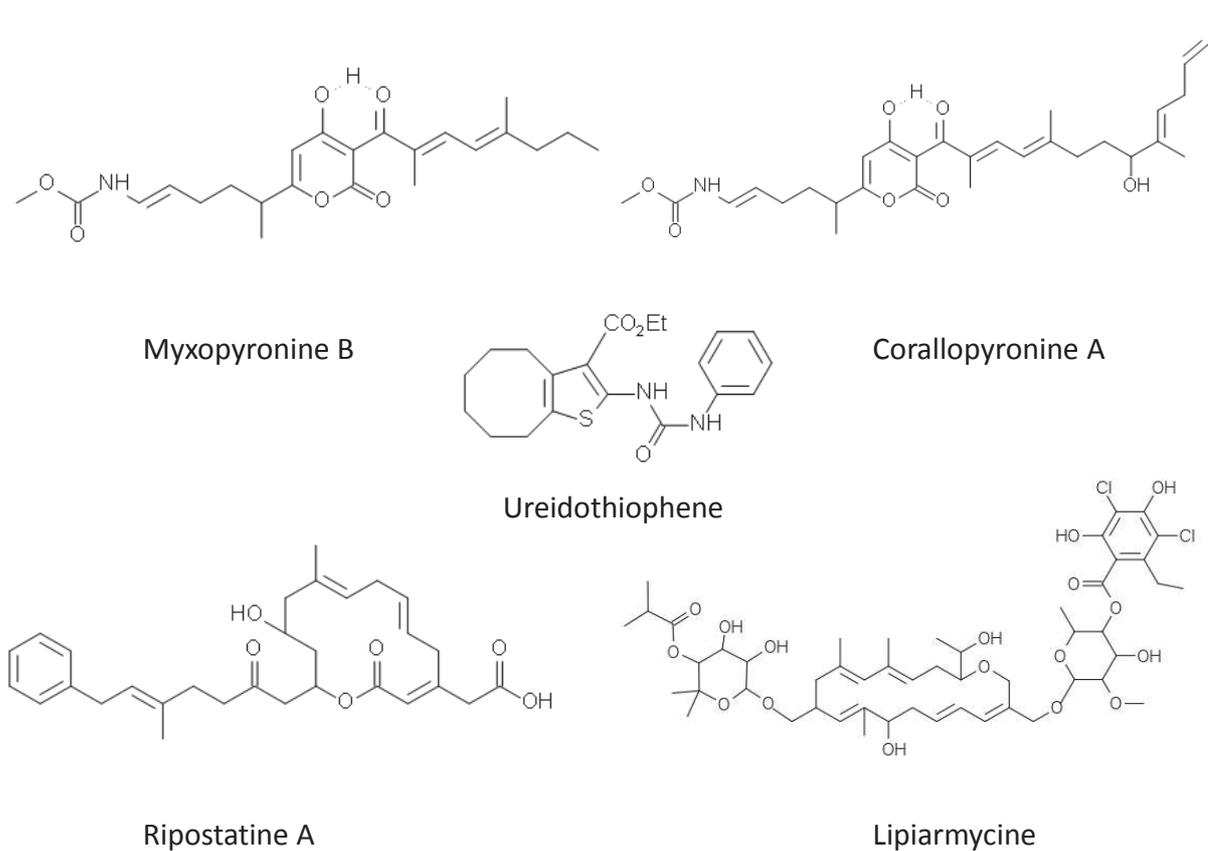
Ureidothiophene se fixant sur le même site que Myx il a été montré qu'il inhibe l'initiation de la transcription selon le même mécanisme (Fruth et al., 2014).

La caractérisation du site de fixation de ureidothiophene a été réalisée par plusieurs approches, sur une série de composés : spectroscopie RMN, Saturation Transfer Difference (STD), INPHARMA (Interligand NOE for Pharmacophore Mapping) et docking. Cette caractérisation suggère qu'ureidothiophene entre en compétition avec Myx, mais il chevauche partiellement son site de fixation. Pour confirmer ces conclusions, plusieurs substitutions d'acides aminés dans la région switch ont été réalisées (Fruth et al., 2014). Les effets de ces mutations tant sur l'inhibition de la transcription de l'ARNP que sur l'activité antibactérienne ont été testés.

Les mutations dans la poche de fixation de Myx au niveau des résidus β (V1275M, E1279K) chez *E. Coli TolC* n'affectent pas l'activité antibactérienne d'ureidothiophene. Les substitutions situées dans les sous-unités β ( S1322, L1291 ) et β' ( K345, K334 , Δ334–5) n'ont pas eu d'effet significatif sur l'activité antibactérienne contre *E. coli TolC*, ni sur l'activité in vitro (Fruth et al., 2014).

Ureidothiophene est capable d'inhiber l'interaction entre le core et le facteur sigma. Ceci indiquerait que le composé pourrait aussi se lier à leur interface. L'existence d'un deuxième site de liaison est ainsi confirmée par STD. Ce composé peut se lier également selon deux orientations. Ce deuxième site de liaison dans l'ARNP pourrait aussi contribuer au fait que les substitutions d'acides aminés dans la région switch n'affectent pas l'activité inhibitrice de

ureidothiophene qui ne présente pas de résistance croisée avec les autres inhibiteurs (Fruth et al., 2014).



**Figure 22.** Structure chimique des inhibiteurs de l'ARNP ciblant le domaine switch-2.

#### **D.IV) Les inhibiteurs de l'interaction entre le core de l'ARNP et la sous-unité $\sigma$**

Pour échapper aux effets des traitements antibiotiques, les bactéries ont développé des mécanismes multiples dont la plupart sont : soit les conséquences de mutations au niveau de la cible des antibiotiques, soit l'activation d'un système de réponse au stress, soit la mise en état de persistance. Ces états sont liés à la régulation de l'activité de l'ARNP qui est contrôlée également par les facteurs sigma. Depuis leur découverte, des progrès énormes ont été faits dans la compréhension de leur rôle au sein de la cellule et par conséquent dans la compréhension du processus d'initiation de la transcription. La reconnaissance des promoteurs et l'amorce de la séparation des brins d'ADN sont des propriétés fondamentales des facteurs sigma chez les procaryotes. Ces propriétés permettent au core de l'ARNP associé aux facteurs sigma primaires d'initier la transcription de la majorité des promoteurs. Ceux-ci identifient non seulement les séquences des promoteurs, mais également orchestrent plusieurs points de contrôle cruciaux au cours de la formation du complexe ouvert. Ils contrôlent également le processus d'initiation abortive, la séparation de l'ARNP du promoteur et les premières étapes du processus d'élongation. Chaque étape du cycle de transcription est hautement régulée par les facteurs de transcription au cours de la croissance cellulaire en réponse aux signaux environnementaux.

Les facteurs sigma sont des protéines flexibles qui établissent de multiples contacts avec l'ARNP en formant un complexe d'initiation de la transcription. La structure du complexe holoenzyme - rifampicine montre que le résidu D513 de la région 3.2 contacte les groupes O4 et O5 de la rifamycine. La délétion de la région 3.2 rend l'ARNP résistante à Rifabutine, ceci suggère que sigma est impliqué dans l'inhibition (Artsimovitch et al., 2005) et peut moduler la sensibilité de l'ARNP à Rif. En effet, il a été démontré que l'ARNP d'*E. coli* contenant le facteur sigma 32 est moins sensible à la Rif que  $\sigma^{70}$  car il y a peu d'homologie de séquence entre  $\sigma^{32}$  et celle de  $\sigma^{70}$  (Wegrzyn et al., 1998).

L'interface entre le core de l'ARNP et  $\sigma^{70}$  représente un site de liaison prometteur. Néanmoins, les études des inhibiteurs ciblant ce site de liaison sont rares. La recherche d'un composé pouvant inhiber la formation de l'holoenzyme et aboutissant ainsi à l'inhibition de l'initiation de la transcription serait un pas important pour la découverte de nouveaux antibiotiques. L'absence de l'homologue du facteur  $\sigma^{70}$  dans les cellules des mammifères permettrait de les utiliser sans effets indésirables chez les eucaryotes.

Plusieurs molécules synthétiques ciblant le facteur sigma ont été identifiées.

#### D.IV.1 Composés SB

Les composés SB ont été identifiés lors du criblage à haut débit de la banque de composés synthétiques ChemBridge<sup>TM</sup>. Ils inhibent l'interaction du facteur sigma et du core de l'ARNP chez *E. coli* (Andre, 2006; André et al., 2004). Il s'agit de composés de faible poids moléculaire (MW ~ 371 Da) comportant un cycle aromatique. Ils sont actifs contre les bactéries à Gram-positif *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *B.anthraxis*, *B. cereus* avec une CMI de 0.3-2 µg/ml, y compris sur des souches de *S. aureus* résistantes à la rifampicine. Les bactéries à Gram-négatif sont majoritairement résistantes à SB à l'exception de *Pasteurella multocida* (CMI = 4µg /ml), cela est probablement dû à l'imperméabilité intrinsèque de leur paroi.

Au sein de ce groupe, la molécule SB2 est inactive contre *M.tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *E.coli* avec une CMI > 33µg/ml, mais elle est active contre *E coli D22* avec une CMI = 2 µg/ml ainsi que sur les biofilms formés par *S. epidermidis* (Villain-Guillot et al., 2007b).

SB2 inhibe la transcription dépendante du facteur  $\sigma$  avec une IC<sub>50</sub> de 2 à 15µM, mais elle inhibe aussi la transcription indépendante du facteur  $\sigma$  avec une IC<sub>50</sub> à 5µM, ce qui indique que la cible préférentielle des molécules SB se trouve au niveau du core de l'ARNP.

Le mécanisme d'action est allostérique car SB inhibe l'ARNP après la formation de l'holoenzyme.

L'avantage de ces composés sur la rifampicine est l'absence d'apparitions de mutations spontanées résistantes (Gualtieri et al., 2006a).

Par comparaison avec d'autres agents antibactériens utilisés en antibiothérapie, les molécules du groupe SB possèdent des limites pharmacologiques du fait de leur forte hydrophobicité et de leur fort taux de liaison avec la sérum albumine humaine.

La région 2.2 du facteur sigma est nécessaire à la formation du complexe d'initiation et elle se lie à la sous-unité  $\beta'$  de l'ARNP appelée  $\beta'$  clamp helix (CH) (Arthur et al., 2000; Ma et al., 2013). Une étude a montré que des peptides imitant  $\sigma_{2.2}$  pourraient inhiber l'interaction entre l'ARNP et le facteur sigma et bloquer l'initiation de la transcription in vitro (Bai et al., 2012; Hüsecken et al., 2013). Ces peptides sont prometteurs pour le développement de composés thérapeutiques car les régions de la famille du facteur  $\sigma^{70}$  ou du facteur  $\sigma^A$  qui interagissent avec le core de l'ARNP, sont fortement conservées dans différentes espèces de bactéries. Ils ont

une activité antibactérienne à large spectre, mais ils sont relativement instables, chers à produire en masse et peu propices à une administration orale (Ma et al., 2013).

#### D.IV.2 Composés GKL

Ils forment une classe de dérivés de bis-indole (**Figure 23**) ; ce sont des composés agissant sur la transcription bactérienne. Ils ont été identifiés lors du criblage virtuel de banques de peptides en utilisant la structure du complexe de l'ARNP et le facteur  $\sigma^A$  de *thermus thermophilus*. Cette stratégie a permis la construction d'un modèle pharmacophore qui a été utilisé pour cribler une bibliothèque de composés. Ce criblage a abouti à la sélection d'1/3 de composés ayant une activité inhibitrice in vitro contre la formation du complexe ARNP- $\sigma$  (Johnston et al., 2009; Ma et al., 2013).

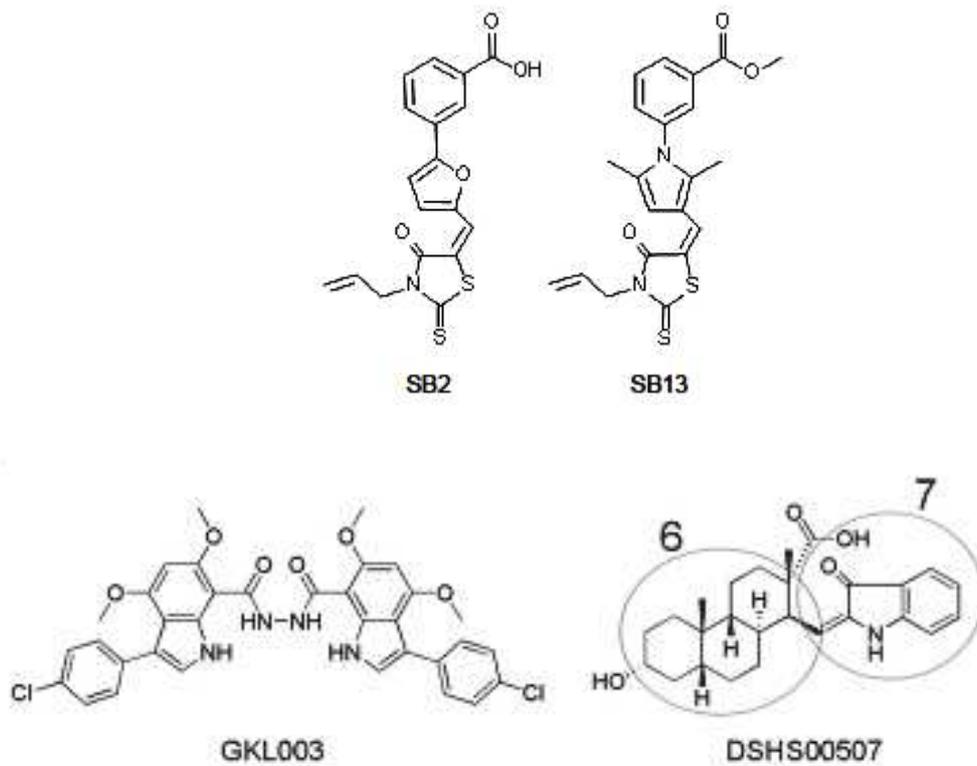
Parmi ces composés, GKL003 se lie spécifiquement à la région CH avec un  $K_i$  de 6 nM déterminé à partir de l'essai de transcription in vitro. C'est un inhibiteur compétitif qui peut aussi inhiber l'initiation de la transcription après la formation de l' holoenzyme (Ma et al., 2013). Malgré son excellente activité in vitro, GKL003 a une faible activité contre les bactéries, probablement en raison de sa faible solubilité dans les milieux aqueux et son incapacité de traverser les membranes bactériennes. Néanmoins à forte concentration, il a présenté un large spectre d'activités antibactériennes contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Kandemir et al., 2014; Mielczarek et al., 2014) . La détermination de la structure du complexe de GKL avec l'ARNP sera importante pour le développement de cette molécule.

#### D.IV.3 Composé DSHS00507

Il a été identifié à partir d'un criblage virtuel de bibliothèques de composés. Il a montré une excellente activité inhibitrice contre la formation de l'holoenzyme (Ma et al., 2016).Ce composé, formé d'un acide carboxylique tricyclique et d'un indolone (**Figure 23**), se lie à la région CH avec une forte spécificité et inhibe la transcription in vitro en empêchant l'interaction de  $\sigma^A$  avec CH. Des essais antibactériens ont indiqué que ce composé est efficace contre les bactéries à Gram positif, y compris contre *Staphylococcus aureus* résistant à méthicilline. DSHS00507 n'a montré aucune activité contre l'ARNP des eucaryotes car la séquence de leur CH diffère de celle des bactéries. Ce composé pourrait constituer une avancée potentiellement utile pour le développement futur d'antibactériens.

En effet, les molécules provenant de bibliothèques chimiques identifiées par HTS semblent cibler des sites distincts de ceux des molécules naturelles. Aucun composé naturel connu n'affecte les interactions entre le core et le facteur sigma. Si l'on considère l'abondance

des composés naturels issus de sources bactériennes, le criblage des molécules naturelles pourrait nous conduire à la découverte d'inhibiteurs transcriptionnels. Les technologies de plus en plus sophistiquées utilisées lors des études structurales permettent de suivre le processus d'initiation à travers toutes les étapes complexes jusqu'à la résolution moléculaire. Actuellement, nous disposons de simples instantanés des différentes étapes qui sont insuffisants pour permettre d'établir leur lien. Cependant, dans les prochaines années, nous pourrions compléter l'étude de ces structures par des techniques innovantes (single molécule ou Cryo-EM) (Arthur et al., 2000), qui permettront de comprendre les réarrangements dynamique des facteurs sigma pendant l'initiation de la transcription et feront ainsi progresser la recherche des antibiotiques.



**Figure 23.** Structure chimique des inhibiteurs ciblant l'interaction entre le core de l'ARNP et la sous-unité  $\sigma$



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<sup>a,b,\*</sup>, Maxime Gualtieri<sup>a,b</sup>, Françoise Roquet-Banères<sup>a,b</sup>, Zakia Morichaud<sup>a,b</sup>, Konstantin Brodolin<sup>a,b</sup>, Jean-Paul Leonetti<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Université Montpellier 1, Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS), CNRS, UMR 5236, 4 Bd Henri IV, CS 60033, F-34293 Montpellier, Cedex 2, France

<sup>b</sup> 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](mailto:audrey.tupin@univ-montp1.fr) (A. Tupin).

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

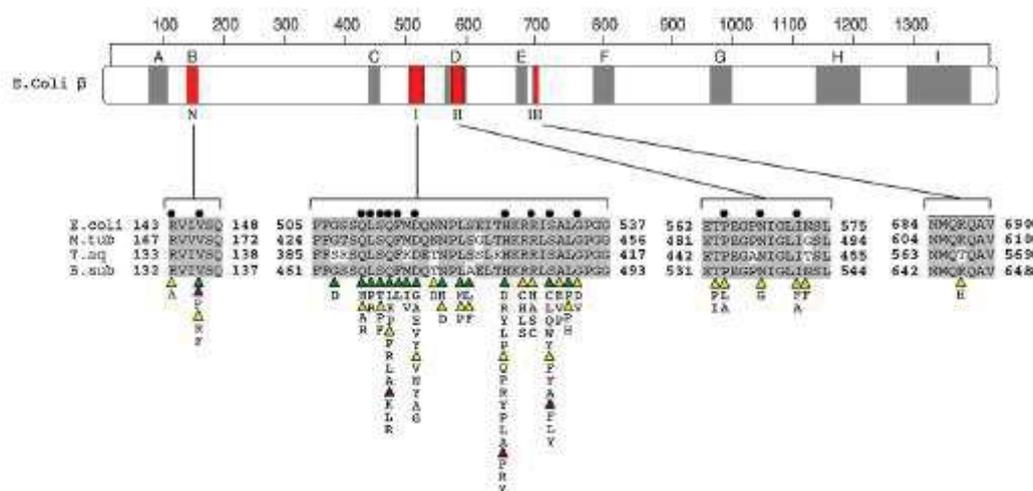


Fig. 1. Location of rifampicin (RIF) resistance mutations in the RNA polymerase (RNAP)  $\beta$ -subunit. The 1342-amino-acid-long  $\beta$ -subunit is represented by the light bar, with grey shaded areas corresponding to the highly conserved sequence segments, designated A–I, and with red shaded areas 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  $\beta$ -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<sup>R</sup>) 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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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<sup>R</sup> 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].

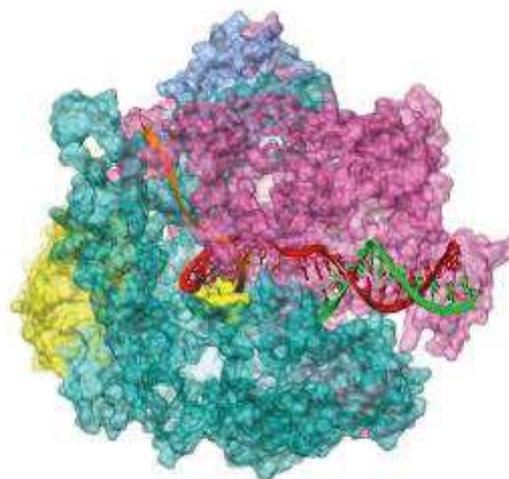


Fig. 2. Rifampicin (RIF)-binding site in the active site of RNA polymerase. The model was built from the Protein Data Bank co-ordinates of the *Thermus aquaticus* core complex (116V [7]) and from a *Thermus thermophilus* core scaffold complex (205J [40]). The  $\alpha$ -subunit is represented in yellow, the  $\beta$ -subunit in blue, 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.)

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<sup>R</sup> mutants [17]. The consequences of this deregulation are, in most cases, reduced virulence [24,25] of the RIF<sup>R</sup> 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  $\beta$ -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  $\sigma^R$ -dependent transcription of the *rbpA* gene and that *rbpA* stimulates  $\sigma^{\text{HrcBB}}$ -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].

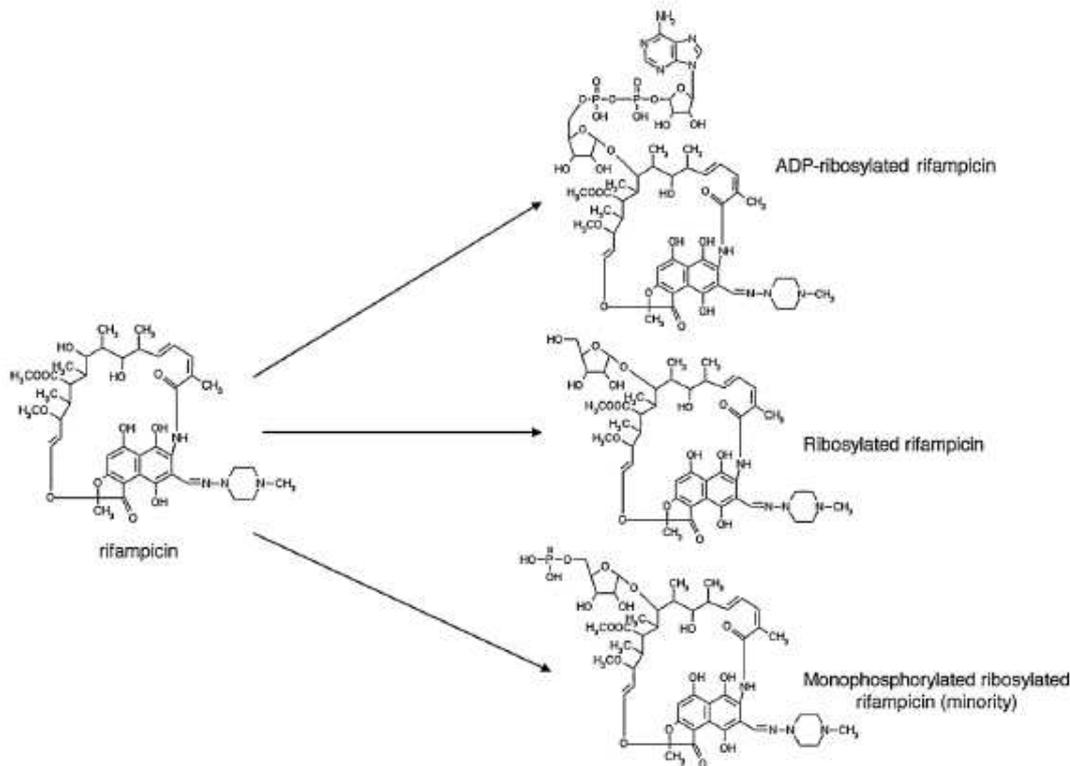
$\sigma$  factors are accessory proteins that bind to the core of RNAP to form the RNAP holoenzyme. Binding of the  $\sigma$  factor allows transcription initiation by directing specific recognition of the promoter and isomerisation of the RNAP–DNA complex. Wegrzyn et al. [39] have reported a differential effect on the inhibition of transcription by RIF depending on the  $\sigma$  factor. RIF was shown to inhibit transcription from the  $\sigma^{70}$ -dependent  $P_L$  promoter at a significantly lower concentration than transcription from the  $\sigma^{32}$ -dependent  $P_{groE}$  promoter. These results may only reflect a selectivity of RIF according to the nature of the  $\sigma$  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*, *Desulfotobacterium hafnense* and *Rhodospseudomonas 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



**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 *mit* operon of *Neisseria gonorrhoeae* encodes an efflux pump system composed of the proteins *mitCDE* [48,49]. This pump transports several antibiotics, and mutations in the *mitR* gene, a transcriptional repressor of *mitCDE*, 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 under-appreciated 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

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. *Farmac 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, Yeampur 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, Korzhova N, Mustae 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  $\beta$  subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Biol Chem* 1993;268:14820–5.
- [11] Severinov K, Soushko M, Goldfarb A, Nikiforov V. Rif<sup>R</sup> 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 rifampicin-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 rifampicin-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 rifampicin-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  $\beta$  subunit) of *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol* 2002;184:3984–91.
- [22] Bergvall IL, Klatzer PR, Schuitema ARJ, Oskam I, 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, Marianielli C, Tarantino M, Pistoia C, Marcon G, et al. Protective properties of rifampin-resistant rough mutants of *Bruceella 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, Bohannon 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, Vanechoutte 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  $\beta$  subunit gene to rifampicin 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'-neotrehalosalidamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 2004;279:3885–92.
- [35] Newell KV, Thomas DP, Brrekakis 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] Flätten 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] Wegryn A, Szalewska-Palasz A, Blaszczyk A, Liberek K, Wegryn G. Differential inhibition of transcription from sigma70- and sigma32-dependent promoters by rifampicin. *FEBS Lett* 1998;440:172–4.
- [40] Vassilyev DG, Vassilyeva MN, Perederina A, Tahirou 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, Arido 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, Chappo K, Yan D, et al. New C25 carbamate rifampicin 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 *mitRCD* efflux system. *Microbiology* 1995;141:611–22.

## **CHAPITRE II : RESULTATS**

## A. Introduction

A la suite de la forte augmentation des résistances aux antibiotiques, la demande de nouvelles classes d'antibiotiques capables de cibler les formes résistantes des pathogènes est croissante. L'ARN polymérase (ARNP), enzyme responsable de la transcription, reste une cible privilégiée des recherches de nouvelles molécules antibiotiques. Parmi celles inhibant l'ARNP, la rifampicine (Rif) et ses analogues sont utilisés en clinique et sont toujours employés en première ligne pour le traitement de la tuberculose. Une nouvelle classe d'antibiotiques incluant la lipiarmycine (Lpm) et la myxopyronine (Myx) a été caractérisée. Ces molécules ciblent une autre région de l'ARNP et ont un mécanisme d'action différent de ceux précédemment décrits. Ces deux antibiotiques sont les premières molécules qui abolissent la formation du complexe actif formé par l'ARNP et le promoteur, et par conséquent sont d'excellents outils pour étudier les mécanismes fondamentaux de la transcription et de sa régulation.

La lipiarmycine a été approuvée en mai 2011 par la FDA sous le nom de Difucid<sup>®</sup> pour le traitement de *Clostridium difficile* responsable de l'augmentation de la fréquence de la plupart des diarrhées secondaires d'origine nosocomiale avec un fort taux de mortalité en Amérique du Nord et en Europe. Lpm est active contre un large spectre de bactéries de type Gram positif uniquement. Elle inhibe spécifiquement l'initiation de la transcription. Elle bloque la formation du RPo. Dans le cas d'infections de *B subtilis* par le bactériophage SPO1, Lpm inhibe la transcription précoce du bactériophage SPO1 qui est dépendante du facteur  $\sigma^A$  de son hôte *B subtilis*. mais n'a aucun effet sur les transcriptions moyennes et tardives (Osburne and Sonenshein, 1980). C'est un antibiotique qui affecte différemment la transcription selon le facteur sigma impliqué. Se référer au paragraphe «Les inhibiteurs de l'ARN polymérase»

Notre équipe a déterminé le site de fixation de la lipiarmycine au niveau des régions switch (Gualtieri et al., 2009) ainsi que son mécanisme d'action qui est l'inhibition de la formation du complexe ouvert. Elle affecte la fonction de l'élément switch-2 par un mécanisme d'action différent de celui de la myxopyronine. La Lpm agit avant Myx au cours de la formation de RPo (Brodolin, 2011; Tupin et al., 2010a).

L'utilisation de nouveaux antibiotiques génère l'apparition de nouvelles résistances dont les cibles et les mécanismes restent à découvrir. Les bactéries ont développé des mécanismes multiples pour échapper aux effets d'un traitement antibiotique. La plupart de ces mécanismes sont liés à la régulation de l'activité de l'ARNP qui est contrôlée par la sous-unité sigma.

Dans cette thèse, nous étudierons la fonction et la structure du facteur  $\sigma^{70}$  qui orchestre les différentes étapes de l'initiation de la transcription des gènes lors de la phase exponentielle de la croissance des bactéries. Celle-ci est essentielle à leur viabilité. Le facteur  $\sigma^{70}$  est structurellement relié au facteur sigma alternatif qui contrôle le développement morphologique, la réponse au stress, l'activation de la virulence et le passage à la phase stationnaire.

L'interaction entre les facteurs sigma et les inhibiteurs de la transcription ainsi que le rôle des facteurs sigma dans la modulation de la sensibilité de la cellule bactérienne aux antibiotiques sont très peu compris.

Le mécanisme spécifique par lequel le facteur  $\sigma$  peut être impliqué dans la génération des résistances en réponse au traitement par les antibiotiques reste à élucider. L'efficacité de l'action des antibiotiques pourrait être directement dépendante de la sous-unité sigma.

Dans cette étude je me suis donc attachée à déterminer les mécanismes précis par lesquels la région 1.2 et la région 3.2 de la sous-unité sigma qui modulent la fusion du promoteur, sont impliqués dans la résistance à la lipiarmycine.

Les résultats de cette étude contribueront de manière significative à la compréhension des bases moléculaires de la résistance aux antibiotiques ; ils fourniront une base pour le développement de nouveaux médicaments plus efficaces et ils feront progresser l'étude des mécanismes fondamentaux de la transcription. Les approches méthodologiques développées pendant ce projet pourront être étendues à l'analyse d'autres antibiotiques ciblant l'ARNP bactérienne et à l'analyse des autres facteurs de transcription.

## **B. Résultats**

La région 3.2 est particulièrement variable selon les différentes espèces bactériennes et selon les différents groupes de sigma. C'est une région conservée chargée négativement. Le positionnement du facteur sigma dans la structure de l'ARN montre que la région 3.2 est constituée en partie d'une boucle qui avance vers le site actif de l'ARNP et occupe en partie le canal de sortie de l'ARN. La boucle est proche du site de fixation de la Lpm. Plusieurs acides aminés de la boucle interagissent avec les domaines fonctionnels de l'ARNP et de l'ADN. Nous nous intéressons aussi à la région 1.2 qui est impliquée dans la formation du complexe ouvert et qui interagit également avec l'ADN.

Le projet fera appel à un ensemble d'approches génétiques et biochimiques en présence de l'ARNP d'*E. coli* sensible à la lipiarmycine et seront complétées par le docking et par la simulation de dynamique moléculaire.

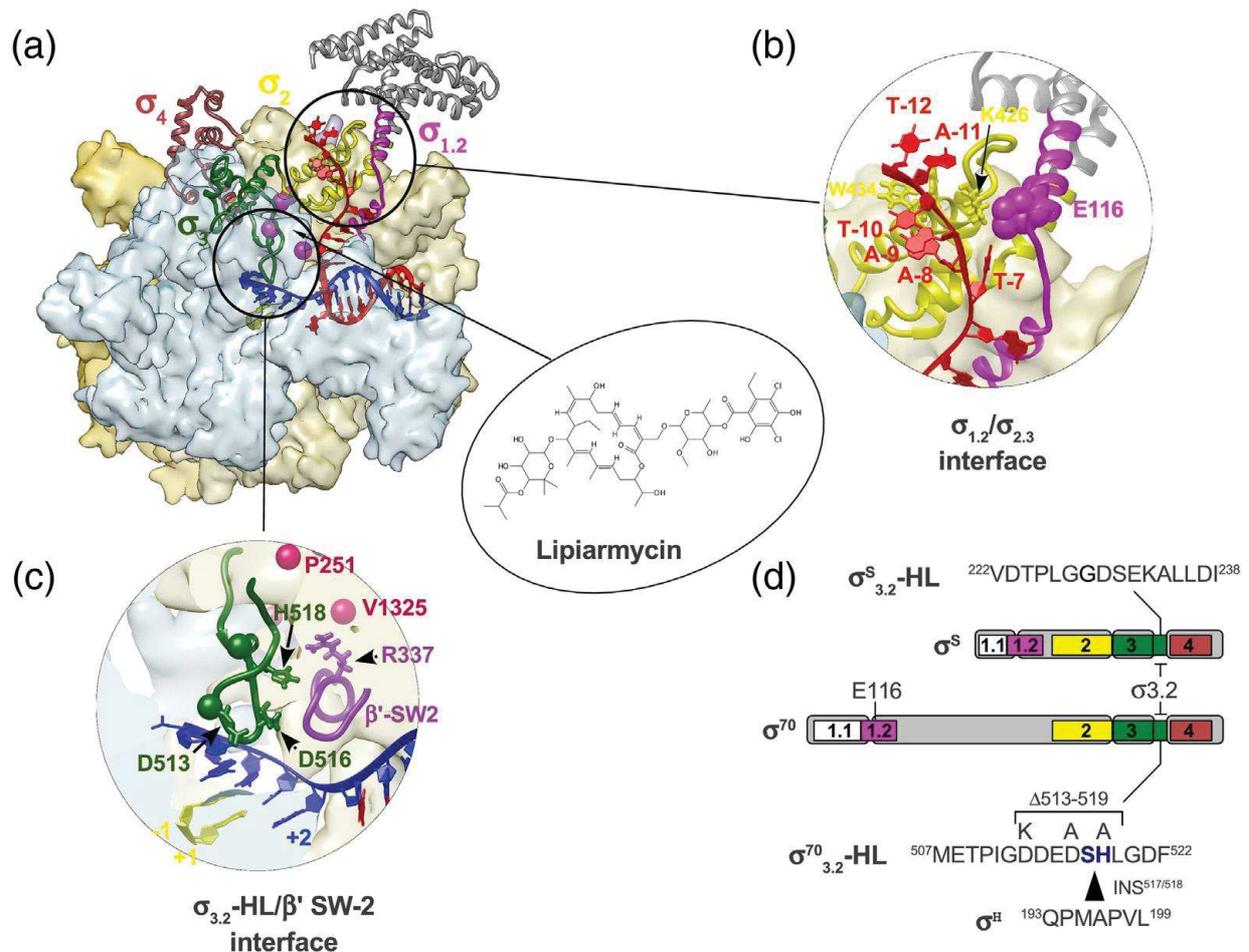
Afin de déterminer comment le changement de la structure de la sous-unité sigma peut affecter l'inhibition de l'ARNP par la lipiarmycine et déterminer l'importance de la fonction de certains acides aminés, nous avons choisi leurs positions selon l'alignement des séquences de cette région avec d'autres sigmas et nous avons construit des mutants (**Figure 24d**) :

- soit par délétion de la boucle 513-516 ( $\sigma_{\Delta 3.2}$ ) afin de faciliter la fixation de la Lpm au niveau du site actif.
- soit par substitution en introduisant une charge positive ou neutre D513K ( $\sigma_{D513K}$ ), D516A ( $\sigma_{D516A}$ ) et H518A ( $\sigma_{H518A}$ ) dans  $\sigma_{3.2}$  qui pourrait changer l'environnement du site de fixation de la lipiarmycine, en perturbant les contacts entre le core de l'ARNP, l'ADN et l'antibiotique ou en créant de nouveaux contacts.

Le résidu D516 se trouve en face de l'élément  $\beta'$  switch 2. Les résidus D513 et D516 contactent le brin matrice de l'ADN au niveau de la position -3 et -4 et le résidu H518 contacte l'élément  $\beta$  switch 3 et  $\beta'$  lid (Basu et al., 2014; Murakami, 2013; Zhang et al., 2012).

- soit par insertion des 7 résidus 193-199 du sigma 32 ( $\sigma^H$ ) entre les résidus 517 et 518 ( $\sigma_{INS}$ ) afin de créer un encombrement stérique qui pourrait interférer avec la fixation de la Lpm et perturbe les interactions entre l'élément  $\beta'$ -SW2 et  $\sigma_{3.2}$  et par conséquent gêne l'inhibition de l'antibiotique.

Afin de voir si un changement de structure dans la région  $\sigma^{70}$  éloignée du site putatif de liaison de la Lpm pourrait affecter l'activité de l'antibiotique, nous avons construit un mutant portant la substitution E116G dans la région 1.2 ( $\sigma_{E116G}$ ). Le résidu E116 est impliqué dans la formation du complexe ouvert (Baldwin and Dombroski, 2001; Zhang et al., 2012) (**Figure 24 b,d**).



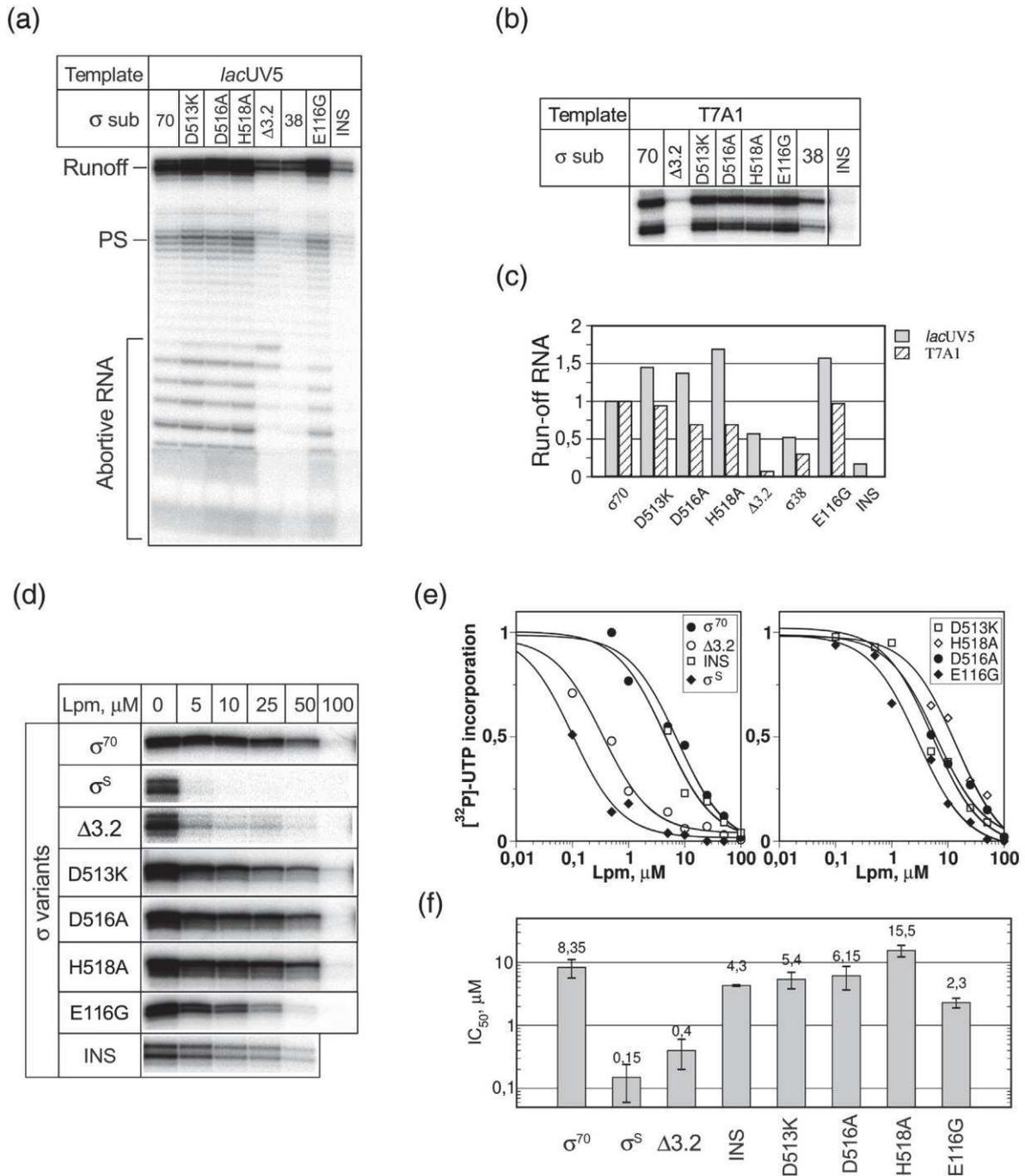
**Figure 24.** Positionnement des mutations de la sous-unité  $\sigma$  dans la structure de l'ARNP.

(a) Structure de  $E\sigma^{70}$  d'*E.coli* (4IGC) avec l'ADN du scaffold (de 4G7O) (brin matrice d'ADN en bleu, brin non matrice en rouge). Primer d'ARN 2nt en positions -1, +1 (jaune). Sous-unité  $\beta'$  (kaki), sous-unité  $\beta$  (bleu clair). Région 1.2 (magenta), région 2 (jaune), région 3 (vert foncé) et région 4 (brun). La région 1.1 a été supprimée. Atomes Ca des résidus impliqués dans la résistance à la Lpm ( $\beta'$ P251,  $\beta'$ R99,  $\beta'$ R337,  $\beta$  V1325,  $\beta$  Q1256 (Gualtieri et al., 2009) (violet).

(b) Interface entre région 1.2 (magenta), région 2.3 (jaune) et brin matrice de l'élément -10 (bleu). Résidus tryptophanes conservés dans la région 2.3 (W433, W434). Résidu K426 dans la région 2.3 et E116 (forme sphérique). (c) Interface entre la région 3.2 (vert),  $\beta'$ -SW2 (pourpre) et brin matrice (bleu). Résidu R337 dans  $\beta'$ -SW2. Mutants dans la région 3.2. Atomes Ca des résidus 512 et 520 portant la délétion 513-519 (forme sphérique).

(d) Plan des sous-unités  $\sigma^{70}$  et  $\sigma^S$  avec les régions conservées 1.1, 1.2, 2, 3, 4 et boucle de la région 3.2 portant les substitutions D513K, D516A, H518A.  $\Delta 513-519$  indiquées par des crochets. Séquence d'insertion (INS<sup>517/518</sup>) des acides aminés 193-199 de la sous-unité  $\sigma^H$  entre les positions 517/518.





**Figure 27.** Effet des mutations dans la sous-unité  $\sigma^{70}$  sur la transcription et sur la sensibilité de l'ARNP à Lpm. (a et b) Activité transcriptionnelle de l'ARNP contenant différents  $\sigma$ . Produits [ $^{32}\text{P}$ ] ARN synthétisés sur les promoteurs *lacUV5* (a) et T7A1 (b).

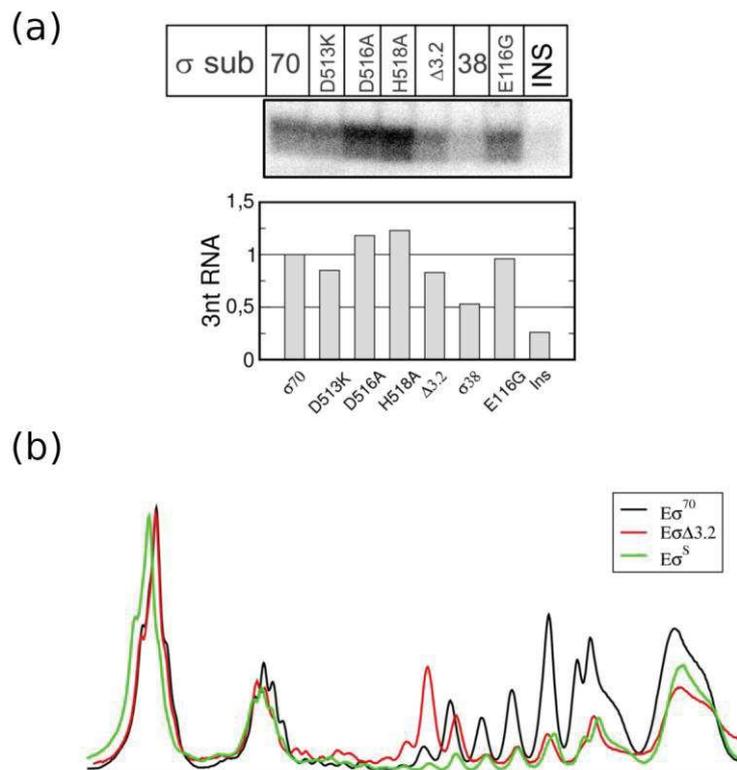
(c) Quantification du run-off dans (a) et (b). (d) Run-off synthétisés sur le *lacUV5* par l'ARNP avec les sous-unités  $\sigma$  indiquées, en présence de concentrations croissantes de Lpm. (e) Quantification Run-off dans (a) Valeurs normalisées selon la quantité d'ARN synthétisée sans Lpm. (f) Valeurs d' $\text{IC}_{50}$  calculées dans (d).

L'activité de l'ARNP contenant  $\sigma_{E116G}$  ( $E\sigma_{E116}$ ) est quasiment la même ou légèrement supérieure à celle du  $E\sigma^{70}$  sauvage suggérant ainsi que le résidu E116 n'est pas essentiel à la synthèse de l'ARN.

On note que l'effet de cette substitution est différent de celui rapporté précédemment pour les substitutions E116K et E116A, qui bloquent complètement la transcription (Baldwin and Dombroski, 2001) ou bien la réduisent de 60 % par rapport au  $\sigma^{70}$  sauvage sur le scaffold qui est un ADN synthétique (Zhang et al., 2012). Cette divergence peut être attribuée à la nature des résidus qui ont été substitués et à la configuration de l'ADN utilisé.

L'ARNP contenant les facteurs sigma portant une seule substitution dans la région 3.2 n'a montré aucun défaut de synthèse de l'ARN par comparaison avec  $\sigma^{70}$ .

$E\sigma_{\Delta 3.2}$  est presque inactif sur le promoteur T7A1 (7% d'activité résiduelle) à faible concentration des NTPs (25  $\mu$ M), en accord avec les études précédentes (Kulbachinskiy and Mustaev, 2006; Pupov et al., 2014). Mais  $E\sigma_{\Delta 3.2}$  a une activité de 50% comparée à l'activité du  $E\sigma^{70}$  sur le promoteur *lacUV5* et produit la même quantité d'ARN abortif 3mer que  $E\sigma^{70}$  (Figure 28a et b).



**Figure 28.** Effet des mutations dans la sous-unité  $\sigma$  sur la synthèse de l'ARN abortif

(a) [ $^{32}$ P] ARN abortifs synthétisés sur le *lacUV5* par l'ARNP avec les sous-unités  $\sigma$  indiquées. (b) Comparaison des produits d'ARN de  $\sigma^{70}$ ,  $\sigma^S$ ,  $\sigma_{\Delta 3.2}$ .

La comparaison des ratios des produits de synthèse d'ARN abortif par rapport au run-off révèle que les substitutions D513K, H518A et E116G ont facilité le passage de l'initiation abortive à l'élongation.

Ces résultats nous laisse suggérer que la région 3.2 n'est pas nécessaire à l'initiation de la synthèse de l'ARN, mais comme cela a été proposé, que cette région participe directement à la liaison du nucléotide (*i*)NTP (Murakami et al., 2002; Young et al., 2002). Cependant l'effet de la délétion de  $\sigma_{3.2}$  dans l'initiation de la transcription dépend de la séquence du promoteur.

Nous constatons que  $E\sigma_{INS}$  n'est pas actif sur le promoteur T7A1 et a une activité significativement réduite sur le promoteur *lacUV5* (**Figure 27a, b**).

Ces résultats nous permettent de conclure que c'est la conformation globale de la région 3.2, et non les contacts spécifiques formés par les résidus, qui joue un rôle critique dans la fonction de  $\sigma$ . En outre, l'intégrité de la région 3.2 de  $\sigma^{70}$  est importante pour permettre à l'ARNP de se séparer du promoteur, mais n'est pas nécessaire à l'initiation de la transcription parce que les défauts d'initiation conférés par la délétion ou l'insertion dans la région 3.2 peuvent être compensés par la séquence d'ADN du promoteur. La divergence de la structure de la région 3.2 entre les facteurs  $\sigma$  alternatifs, peut déterminer la sélectivité de promoteur par l'ARNP.

### **B.I) Sigma S ( $\sigma^S$ ) possède les mêmes propriétés que les mutants au niveau de la région 3.2**

Le facteur  $\sigma^S$  ( $\sigma^{38}$ ) codé par le gène *rpoS* a un poids moléculaires de 38 kDa inférieur à celui de  $\sigma^{70}$ , car il ne possède pas le domaine non conservé de 245 résidus situés entre les régions 1.2 et 2.1 (Lonetto et al., 1992; Malhotra et al., 1996). De plus,  $\sigma^S$  contient une plus petite région 1 que  $\sigma^{70}$  (**Figure7**).

$\sigma^S$  contrôle la transcription de quelques centaines de gènes impliqués dans la survie des bactéries en phase stationnaire. Il joue un rôle clef dans la réponse au stress (radiation UV, variations du pH, choc osmotique et stress oxydatif), ainsi que dans le développement des biofilms et dans la virulence. Sa concentration cellulaire est étroitement contrôlée par des mécanismes de transcription et de traduction et par protéolyse. Mais dans la phase stationnaire, cette concentration peut atteindre jusqu'à 30% de celle de  $\sigma^{70}$  (Jishage et Ishihama, 1995).  $\sigma^S$  est considéré comme le deuxième facteur sigma principal chez *E. coli* (Nguyen et al., 1993; Tanaka et al., 1993).

La région 3.2 de  $\sigma^S$  diffère de 8 résidus sur 16 par rapport à celle de  $\sigma^{70}$  (**Figure 25 et 27d**). Afin de tester si les variations de séquence peuvent affecter la fonction de la région 3.2, nous

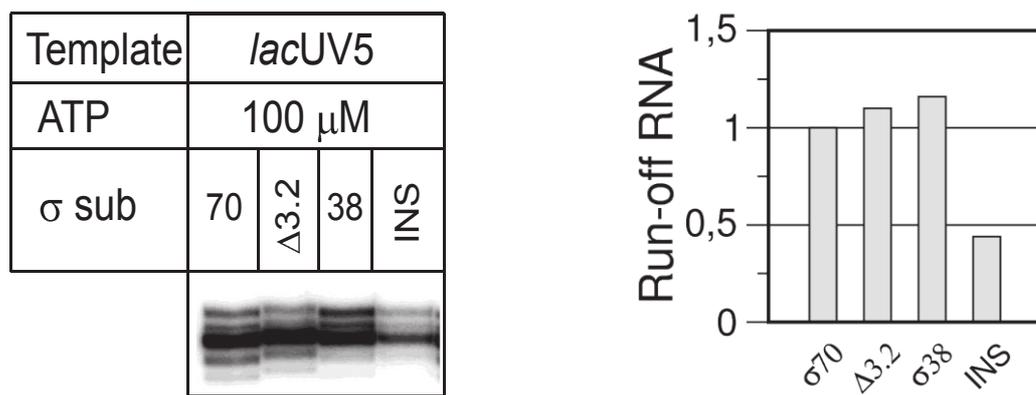
avons réalisé des expériences de transcription *in vitro* en présence des promoteurs *lacUV5* et T7A1 à faible concentration de NTPs (25  $\mu$ M).

La quantité des produits longs (run-off) produite par  $E\sigma^S$  est réduite par rapport à celle produite par  $E\sigma^{70}$  (**Figure 27a et b**). Mais le profil des produits d'ARN observés au cours de la transcription par  $E\sigma^S$  sur le promoteur *lacUV5* est étonnamment semblable aux profils des produits d'ARN obtenus par  $E\sigma_{\Delta 3.2}$  et  $E\sigma_{INS}$ , tous caractérisés par l'absence de produits abortifs intermédiaires (**Figure 28b**).

Ces résultats sont surprenants parce que l'origine des produits abortifs est d'habitude attribuée au clash stérique entre l'ARN en extension et la région 3.2 (Murakami et al., 2002). La région 3.2 étant également présente chez  $\sigma^S$  et  $\sigma_{INS}$  et on s'attend à voir d'avantage de produits abortifs courts.

La seule explication est que la région 3.2 de  $\sigma_{\Delta 3.2}$  et celle de  $\sigma_{INS}$  ne bloquent pas stériquement la sortie de l'ARN au cours de l'étape d'initiation car leur conformation diffère de celle du  $\sigma^{70}$ .

On note également que, dans les mêmes conditions, mais en présence d'une augmentation de la concentration iNTP (100  $\mu$ M d'ATP) (**Figure 29**), les quantités de produits d'ARN synthétisés par  $\sigma_{\Delta 3.2}$  ou  $\sigma^S$  ont atteint le niveau de ceux produits par  $\sigma^{70}$  et l'activité de  $\sigma_{INS}$  a été stimulée d'environ trois fois. Cette expérience montre que la faible activité de la transcription de  $E\sigma_{\Delta 3.2}$ ,  $E\sigma^S$  ou  $E\sigma_{INS}$  peut être améliorée par l'augmentation de la concentration des NTP (Pupov et al., 2014).



**Figure 29.** Synthèse des run-off par différents sigma à 100  $\mu$ M NTP et leur quantification.

## B.II) Effet des mutations sur l'inhibition par la lipiarmycine

Pour évaluer l'impact de la structure de sigma sur la capacité de la lipiarmycine à inhiber la transcription, les différents sigmas ont été testés lors de la transcription sur le promoteur *lacUV5* en présence de concentrations croissantes de Lpm avant l'ajout du promoteur *lac UV5* (**Figure 27d**).

L'expérience montre que  $E\sigma^{70}$  est inhibé à une  $IC_{50} \sim 8 \mu\text{M}$  (**Figure 27e, f**), tandis  $E\sigma^S$  est inhibé avec une  $IC_{50} \sim 150 \text{ nM}$ . Ce dernier est 50 fois plus sensible que le  $\sigma^{70}$  sauvage. La délétion dans la région 3.2 ( $\sigma_{\Delta 3.2}$ ) a aussi augmenté de l'ordre de 20 fois la sensibilité de l'ARNP à la Lpm ( $IC_{50} \sim 0,4 \mu\text{M}$ ), tandis que  $E\sigma_{\text{INS}}$  présente une sensibilité deux fois plus importante que celle de  $E\sigma^{70}$  ( $IC_{50} \sim 4,3 \mu\text{M}$ ).

Aucun sigma avec une seule substitution dans la région 3.2 n'a produit d'effet fort sur l'inhibition par la Lpm. Une simple augmentation marginale de la sensibilité a été observée avec  $E\sigma_{\text{H513A}}$  ( $IC_{50} \sim 5.4 \mu\text{M}$ ), alors que presque aucun changement n'a été observé avec  $E\sigma_{\text{H516A}}$  (**Figure 27e, f**).

$\sigma_{\text{H518A}}$  qui pourrait perturber l'interaction entre le résidu H518 et l'élément  $\beta'$  switch2, s'est montré  $\sim 2$  fois plus résistant à la Lpm.

L'effet des mutations de la région 3.2 sur la transcription et l'inhibition par Lpm peut s'expliquer par deux mécanismes :

- La région 3.2 de  $\sigma^S$  et de  $\sigma_{\text{INS}}$  peuvent adopter une conformation différente de celle de la région 3.2 du  $\sigma^{70}$  sauvage. Elles n'interfèrent pas avec la fixation de la Lpm ou augmente l'affinité de la Lpm à l'ARNP.
- Les changements de conformation dans la région 3.2 affectent allostériquement l'inhibition de la Lpm en changeant la capacité de l'ARNP à former le complexe RPo.

La combinaison des deux mécanismes est possible.

## B.III) La substitution E116G dans la région 1.2 de $\sigma^{70}$ augmente la sensibilité de l'ARNP à Lpm.

La région 1.2 est assez conservée parmi les facteurs  $\sigma$  du groupes 1 et 2 (Lonetto et al., 1992). Elle établit des interactions spécifiques avec la séquence GGG «**élément discriminatoire**» située en aval de l'élément -10 du promoteur au niveau du brin non matrice (Haugen et al., 2006). Cette région module allostériquement la reconnaissance de l'élément -10 du promoteur par la région 2.3 (Zenkin et al., 2007). Elle est nécessaire à la fusion du promoteur et à la formation du complexe RPo (Young et al., 2001). Le résidu conservé E116 de

la région 1.2 de  $\sigma^{70}$  est placée à  $\sim 60$  Å du site putatif de liaison de la Lpm (Gualtieri et al., 2009) (**Figure 24a,c**).

$E\sigma_{E116G}$  utilisé lors de la transcription *in vitro* se montre quatre fois plus sensible à la Lpm que  $E\sigma^{70}$  avec une  $IC_{50} \sim 2,3$   $\mu$ M (**Figure 27d, f**). On constate que l'activité transcriptionnelle du mutant  $E\sigma_{E116G}$  est la même que celle de  $E\sigma^{70}$  (**Figure 27**). Si l'on suppose que le site putatif de fixation de la Lpm est localisé au niveau du site actif de l'ARNP, la substitution E116G ne peut pas directement affecter la fixation de la Lpm et son effet sur l'inhibition serait allostérique. La mutation E116G atténue probablement l'action de la Lpm en compromettant l'isomérisation du complexe R<sub>Pc</sub> vers R<sub>Po</sub>, car la région 1.2 est impliquée dans la formation du complexe R<sub>Po</sub> (Baldwin and Dombroski, 2001; Haugen et al., 2006; Wilson and Dombroski, 1997; Zenkin et al., 2007) qui est inhibé par la Lpm. Aussi nous proposons que les fortes variations de la sensibilité de l'ARNP à la Lpm puissent être liées aux activités de reconnaissance et de fusion du promoteur par le facteur  $\sigma^{70}$  qui sont essentielles à la formation du complexe R<sub>Po</sub>.

#### **B.IV) L'hétéroduplex de l'ADN dans le promoteur *lac UV5* abolit l'action de la Lpm**

Nous chercherons à savoir si la Lpm peut inhiber la transcription, lorsque les fonctions du facteur sigma ne sont plus indispensables à la nucléation du promoteur.

Des expériences de transcription ont été menées sur un hétéroduplex *lacUV5* synthétique contenant la bulle de transcription (***lac-bubble***) de la position -5 à la position -11 (**figure. 30a**) avec  $E\sigma^{70}$  et avec  $E\sigma_{\Delta 3.2}$  à des concentrations croissantes de Lpm (**Figure 30b, c**). L'hétéroduplex promoteur *lacUV5* a été utilisé comme élément de contrôle.

Les résultats montrent qu' $E\sigma^{70}$  ou  $E\sigma_{\Delta 3.2}$  ont une activité semblable sur *lac-bubble* tandis que la transcription avec l'hétéroduplex *lacUV5* a montré une sensibilité croissante plus marquée avec  $E\sigma_{\Delta 3.2}$  qu'avec  $E\sigma^{70}$  sauvage.

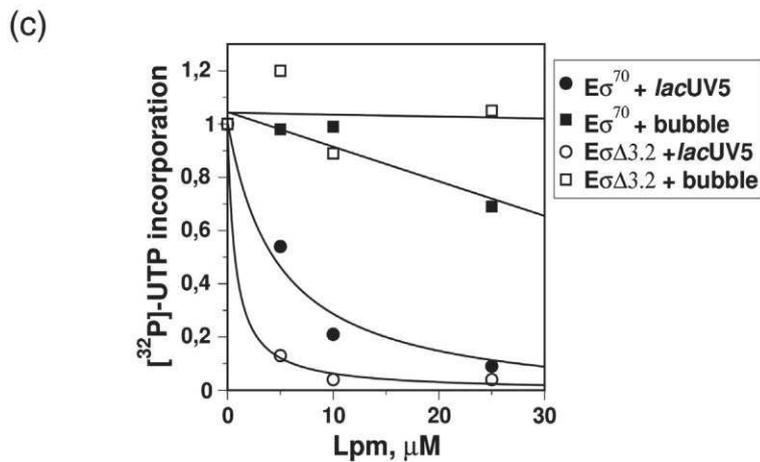
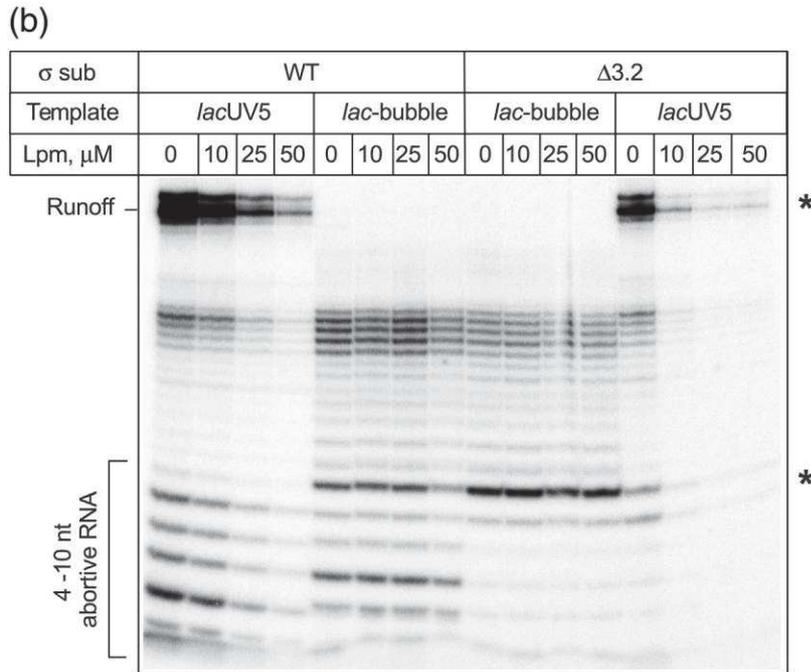
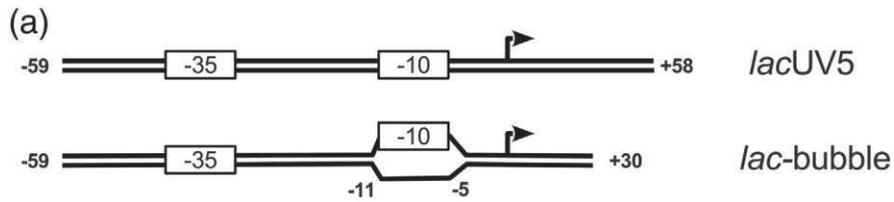
L'absence de transcrits courts de 4 à 8 nt sur *lac-bulle* et sur *lacUV5*, en présence de  $E\sigma_{\Delta 3.2}$  pourrait être liée à l'absence de la région 3.2. Celle-ci empêche l'extension de la chaîne d'ARN.

La transcription sur *lac-bubble* est entièrement résistante à la Lpm et la délétion de la région 3.2 n'a aucun effet sur la sensibilité de l'ARNP à l'antibiotique. Donc *lac-bubble* donne les mêmes résultats lorsque Lpm est ajoutée après la formation du complexe.

Nous en concluons que la lipiarmycine devrait être déplacée du site de liaison par l'ADN ou bien l'ARNP pourrait accueillir l'ADN et la lipiarmycine dans le site actif.

Nous favoriserons le mécanisme de déplacement parce que, si l'on considère la taille de la lipiarmycine, il reste peu d'espace pour les deux ligands.

Les résultats obtenus sur *lac*-bubble suggèrent que, lorsque l'étape de la fusion du promoteur dépend du facteur sigma, la sensibilité de l'ARNP à la Lpm dépend fortement de la structure de la région 3.2.de sigma.



**Figure 30.** Influence de la structure de l'ADN sur la sensibilité de l'ARNP à Lpm.

(a) Promoteur *lacUV5* et hétéroduplex *lacUV5* synthétique contenant la bulle de transcription (*lac-bubble*). Eléments -10 et -35 du promoteur *lacUV5* (rectangle) et site d'initiation de la transcription (flèche).

(b) Transcription sur promoteur *lacUV5* et *lac-bubble* en présence de concentrations croissantes de Lpm.

(c) Quantification de (b). Les astérisques indiquent les bandes qui ont été utilisées pour la quantification.

## **B.V) La délétion de la région 3.2 et la lipiarmycine déstabilisent les interactions entre l'ARNP et l'ADN aval.**

Lors de la formation du complexe ouvert, l'ADN aval doit entrer dans le canal principal et interagir avec les différents domaines de l'ARNP présents dans ce canal afin de former une bulle de transcription. La Lpm cible l'isomérisation du complexe RPc vers le complexe RPo et cela pourrait empêcher la formation de contacts stables entre l'ADN et les domaines responsables de la formation du complexe ouvert. Nous supposons que les changements de la sous-unité sigma conférant l'hypersensibilité à la Lpm pourraient avoir un impact sur la formation du complexe RPo.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons effectué des expériences de footprint à la DNase I sur le promoteur *lacUV5*, à 37°C en présence d'ARNP contenant soit  $\sigma^S$ , soit  $\sigma_{\Delta 3.2}$  soit  $\sigma^{70}$  en l'absence ou en présence de 50  $\mu\text{M}$  de Lpm (**Figure 31a et c**) et nous avons comparé les structures des différents complexes RPo.

Ces résultats montrent que le promoteur *lacUV5* est protégé par  $E\sigma^{70}$  de la position -46 à +16 avec deux sites très sensibles à la DNaseI (DHS) autour des positions -26 et -37 (**Figure 31a**). Avec  $E\sigma^S$ , *lacUV5* présente une protection faible au niveau de l'élément -35 et ne présente pas de sites hypersensibles. Les positions -18 et -19 qui sont normalement protégées par le domaine  $\sigma_3$ , sont accessibles à la DNaseI. Ceci est en accord avec les résultats déjà publiés (Colland et al., 1999) qui montrent que les interactions des domaines 3 et 4 de  $\sigma^S$  et  $\sigma^{70}$  avec le promoteur *lacUV5* sont différentes (**Figure 31c**).

$E\sigma_{\Delta 3.2}$  protège le promoteur de la position de -24 à -46 de la même manière qu' $E\sigma^{70}$  ; tandis que la partie avale du promoteur de la position -24 à +16 présente une faible protection par  $E\sigma_{\Delta 3.2}$  (**Figure 31c**).

Les différences les plus marquées ont été observées au niveau de la protection de la partie avale de l'ADN de la position +14 à +16; ce qui pourrait refléter la déstabilisation des interactions entre les domaines jaw/clamp de l'ARNP et la partie avale de l'ADN (Drennan et al., 2012).

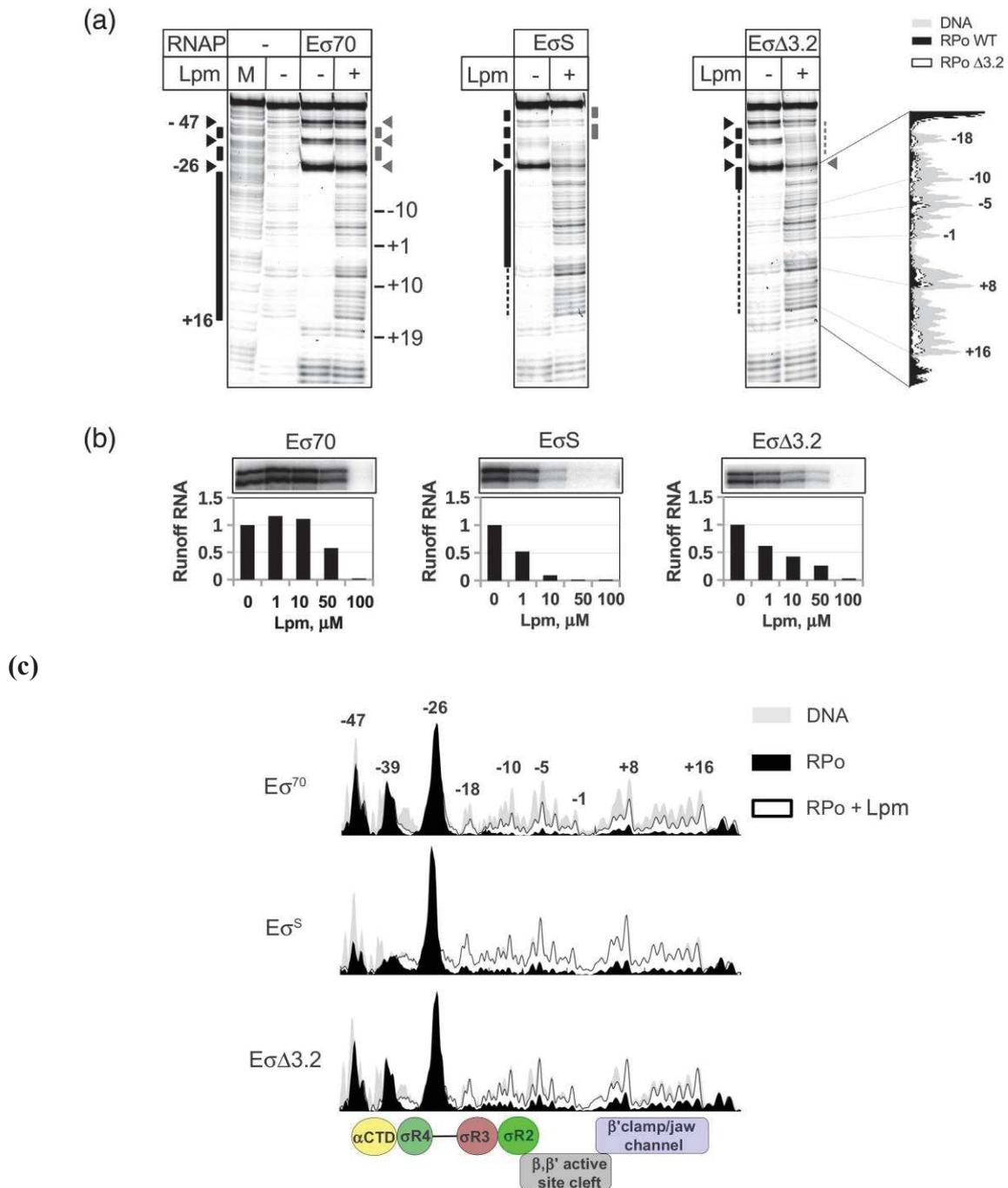
En présence de Lpm, les interactions entre l'ADN et  $E\sigma^{70}$  au niveau de la partie amont jusqu'à la position -25 sont identiques à celles obtenues en l'absence de l'antibiotique. Par contre la protection de l'ADN est réduite entre les positions -25 et +16, en accord avec les résultats déjà publiés (Tupin et al., 2010a). Cela pourrait indiquer la présence du complexe RPc et du complexe RPo.

Dans le complexe R<sub>Pc</sub>, les contacts entre l'ADN aval et l'ARNP sont soit absents, soit instables, alors que le complexe R<sub>Po</sub> présente une protection qui s'étend jusqu'à la position +16 de l'ADN.

E $\sigma^S$  et E $\Delta_{3.2}$  n'établissent pas d'interactions stables en aval de la position -26 en présence de Lpm. Par contre la partie amont de l'ADN a été fortement inhibée.

Ces résultats ont été également confirmés par la transcription in vitro réalisée dans les mêmes conditions (**Figure 31b**).

Nos résultats indiquent qu'en présence de la Lpm, l'holoenzyme contacte l'ADN du promoteur au niveau de l'élément -35 par la région 4 du facteur  $\sigma$ , et en amont de cet élément par la sous-unité  $\alpha$ CTD de l'ARNP. Mais elle ne peut pas établir de contacts stables ni avec l'élément -10, ni avec la partie avale de l'ADN.



**Figure 31.** Sensibilité du RPo de E $\sigma$ <sup>70</sup>, E $\sigma$ <sup>S</sup>, E $\sigma$  $\Delta$ 3.2 à Lpm (a) Footprint DNase I du RPo formé sur le promoteur *lacUV5* par E $\sigma$ <sup>70</sup>, E $\sigma$ <sup>S</sup> et E $\sigma$  $\Delta$ 3.2 en présence ou en absence de 50 $\mu$ M Lpm. *LacUV5* portant deux fluorophores cy3 et cy2. Marqueur (M). (b) Run-off synthétisés sur *lacUV5* par E $\sigma$  indiquées et réalisés dans les mêmes conditions que (a) en présence de concentrations croissantes de Lpm. Valeurs normalisées à la quantité d'ARN synthétisée sans Lpm. (c) Comparaison du footprint DNase I, ADN libre (gris), RPo (noir), RPo en présence de Lpm (blanc). Positionnement des domaines fonctionnels de l'ARNP indiqué en bas.

## B.VI) Les régions 1.2 et 3.2 de $\sigma^{70}$ modulent la sensibilité au froid au cours de la fusion du promoteur

La formation de la bulle de transcription commence au niveau de l'élément -10 et se propage vers le site d'initiation de la transcription. Les régions 2, 1.2 et 3.2 sont impliquées dans la stabilisation de cette bulle par les interactions avec l'ADN. Comme la lipiarmycine inhibe la formation du complexe ouvert, nous pouvons penser que les sigmas qui ont une forte sensibilité à la Lpm peuvent affecter la formation de complexe RPo. La fusion du promoteur par l'holoenzyme est un processus fortement dépendant de la température et du changement de conformation de l'holoenzyme lui-même dépendant de la nature du sigma et du core.

Nous avons voulu savoir si les mutations conférant la sensibilité à la Lpm peuvent affecter la fusion du promoteur.

Pour cela nous avons réalisé des expériences de footprint en présence de  $\text{KMnO}_4$  sur le fragment du promoteur *lacUV5* portant deux fluorophores cy3 et cy2 (**Figure 32 et 33**). Les thymines deviennent accessibles à  $\text{KMnO}_4$  pendant la formation de bulle de transcription. Elles sont oxydées puis clivées par un traitement thermique en présence de la pipéridine. Le marquage du promoteur *lacUV5* a permis de suivre trois événements :

- la fusion de l'élément -10 du promoteur par la région 2 est mise en évidence par la modification des thymines T-8, T-9, T-11.
- L'accessibilité des bases de l'élément discriminant est reflétée par la modification des thymines T-5, T-3
- L'ouverture du site d'initiation de la transcription (tss) se manifeste par la modification des thymines, T+1, T+3, T+4 (**Figure 32a**).

La fraction d'ADN du promoteur *lacUV5* engagée dans la formation du RPo a été calculée et correspond au ratio de l'ADN clivé sur l'ADN total engagé dans la réaction.

L'ARNP contenant le facteur sigma portant les substitutions D513K, D516A et H518A, a formé un complexe RPo avec la même efficacité que le facteur  $\sigma^{70}$ . Dans le cas du mutant sigma D513K une légère augmentation est détectable (**Figure 33a**). Donc, la substitution d'un seul résidu dans la région 3.2 peut changer la conformation de l'ADN. Seule une diminution légère de la fraction du RPo a été observée dans les cas d' $E\sigma_{E116G}$ ,  $E\sigma_{\Delta 3.2}$  et  $E\sigma_{INS}$ .

$E\sigma^S$  a formé quatre fois moins de complexe RPo qu' $E\sigma^{70}$  (**Figure 32c**). Cette différence est causée en partie par la faible affinité du  $\sigma^S$  pour l'ARNP (Kusano et al., 1996). Cependant, les résultats du footprint à la DNase I ont également été proches (**Figure 31a**).  $\sigma^S$  pourrait être déficient dans la fusion de promoteur.

L'analyse de l'efficacité de la formation du complexe RPo effectuée en présence de 50  $\mu$ M de Lpm a montré qu' $E\sigma^{70}$  et  $E\sigma_{H518A}$  ont été inhibés à 50 % (**Figure 32c**). Cela est en accord avec les résultats obtenus lors du footprint à la DNase I qui montraient l'existence des deux complexes RPo et RPe dans le cas d' $E\sigma^{70}$ .

L'ARNP contenant l'un des sigma ( $\sigma_{D513K}$ ,  $\sigma_{D516A}$  et  $\sigma_{INS}$ ) est plus sensible à Lpm que  $E\sigma^{70}$ . L'inhibition la plus forte a été observée avec  $E\sigma^S$ ,  $E\sigma_{\Delta 3.2}$  et  $E\sigma_{E116G}$  (**Figure 32c**). Ces résultats sont en parfaite concordance avec les valeurs  $IC_{50}$  obtenues lors de la transcription (**Figure 27 f**).

Il n'y a aucune corrélation évidente observée entre la sensibilité à Lpm et la capacité de fusion du promoteur par l'ARNP.

Nous avons testé la capacité des différents sigmas à former un complexe RPo dans des conditions telles que la fusion de l'ADN devient dépendante du changement conformationnel de l'ARNP à différentes températures (Buc and McClure, 1985; Rogozina et al., 2009). La formation des complexes de l'ARNP avec le promoteur *lacUV5* à différentes températures (15°C, 20°C, 25°C, 30°C et 37°C) a été réalisée par des expériences de footprint en présence de  $KMnO_4$  (**Figure 33b, c, 34 et 35**).

L'efficacité de l'ouverture de l'ADN à chaque position des thymines a été quantifiée. Dans le cas du  $\sigma^{70}$ , l'ADN s'ouvre au niveau de l'élément -10 à une  $T_m$  de  $\sim 20^\circ$ , et s'ouvre également au niveau du site d'initiation de la transcription (tss) à une  $T_m$  de  $\sim 25^\circ$  (**Figure 33c**). La délétion dans la région 3.2 a augmenté la  $T_m$  au niveau de l'élément -10  $\sim 24^\circ$ , et également au niveau du (tss)  $\sim 27^\circ$ ; mais elle a diminué légèrement la différence de la  $T_m$  entre les parties amont et aval de la bulle de transcription (**Figure 32b et 33**).

Les ARNPs contenant les facteurs  $\sigma$  portant les substitutions d'acides aminés : D513K et H518A, n'ont montré aucune sensibilité au froid au cours de la fusion du promoteur (**Figure 34 et 35a**). La substitution D513K a diminué la température de transition de tss qui s'approche de  $T_m$  de l'élément -10 (Zenkin et al., 2007).

L'ensemble de ces données montre que la région 3.2 est impliquée dans la stabilisation et dans le maintien de la bulle de transcription dans le complexe RPo.

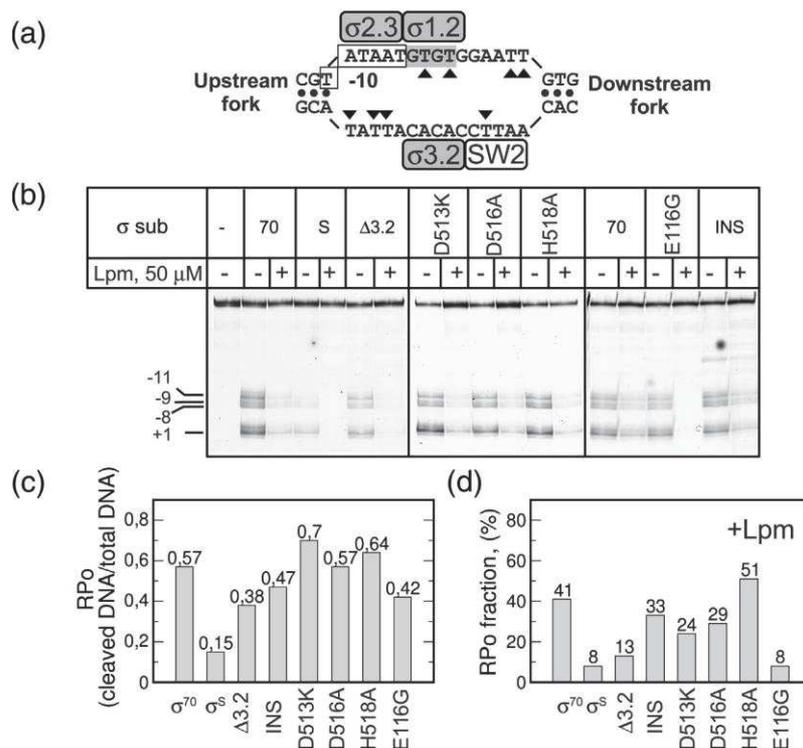
$E\sigma_{E116G}$  a montré une dépendance encore plus forte à la température avec une  $T_m$  supérieure à 30°C largement supérieure à la température de fusion de celle de  $E\sigma^{70}$ , nous suggérant ainsi que la région 1.2 joue un rôle critique dans la formation du complexe RPo, probablement en stabilisant les contacts entre le domaine  $\sigma_2$  et l'élément -10.

La dépendance à la température de la formation de la bulle de transcription par  $E\sigma^S$  était semblable à celle d' $E\sigma_{E116G}$  et d' $E\sigma_{\Delta 3.2}$ .

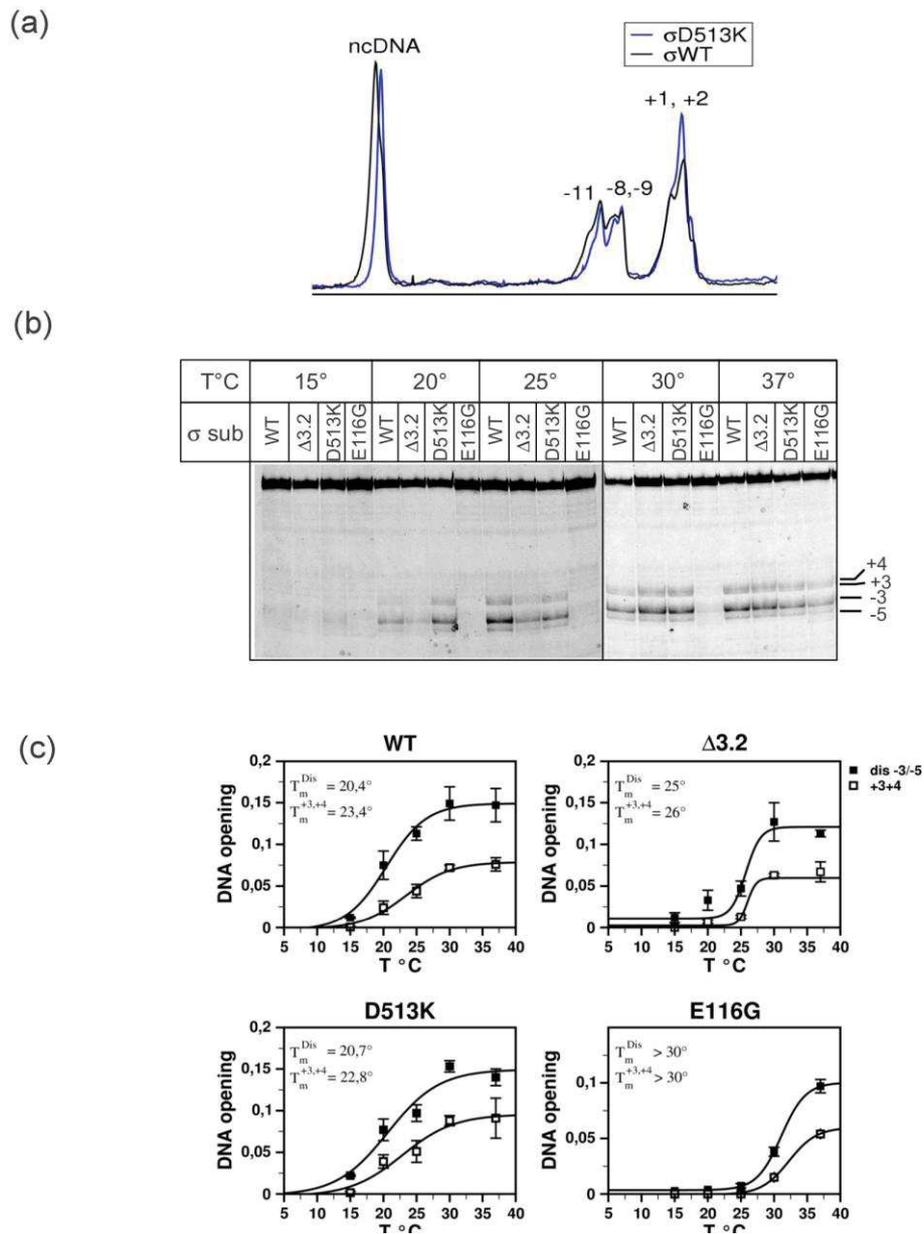
$E\sigma^S$  nécessite une haute  $T_m$  pour l'ouverture de la bulle, mais il n'y a aucune différence de  $T_m$  entre les régions en amont et en aval de la bulle de transcription. Cela indique que la structure des régions 1.2 et 3.2 pourrait être responsable de l'augmentation de la sensibilité au froid de  $E\sigma^S$  (Figure 35c, d).

Le fait que toutes les variantes de sigma hypersensibles à Lpm ont aussi une haute température de transition, nous amène à suggérer que la délétion de la région 3.2 et la substitution E116G dans la région 1.2 pourraient affecter la fixation de la Lpm allosteriquement en compromettant la formation du RPo.

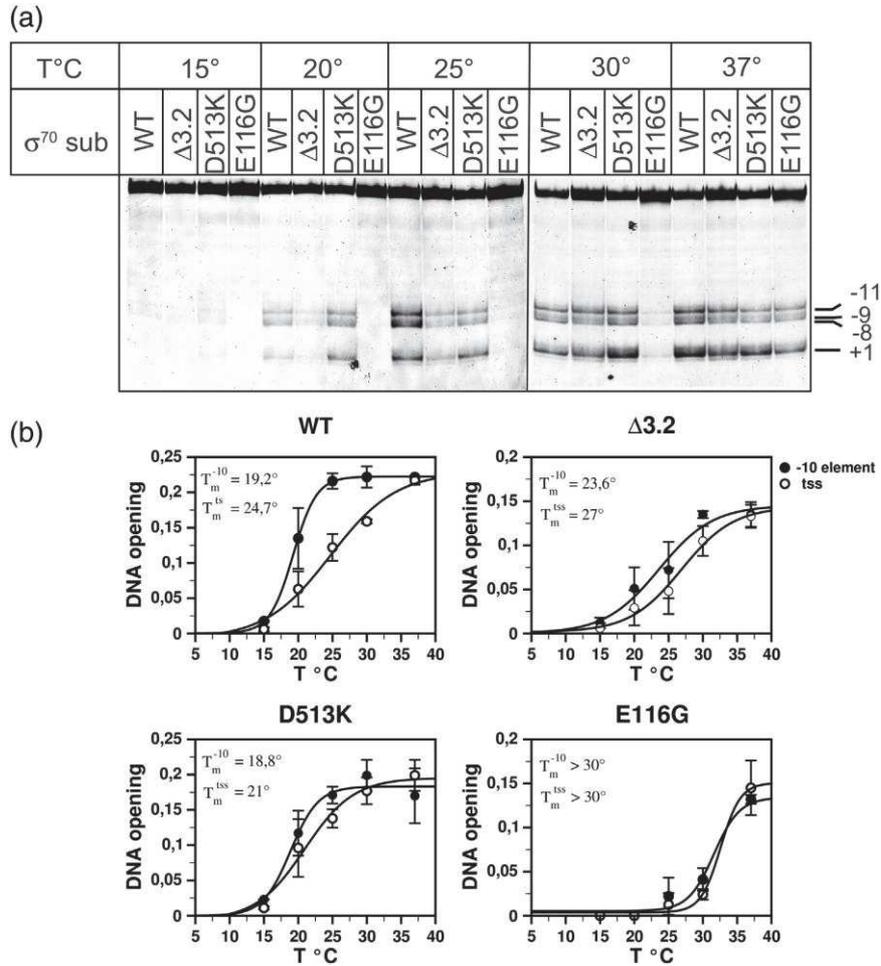
L'insertion des 7 résidus 193-199 du sigma 32 ( $\sigma^H$ ) entre les résidus 517 et 518 ( $\sigma_{INS}$ ) ainsi que les substitutions des acides aminés D513K et D516A n'ont pas eu d'effets sur la fusion du promoteur, mais  $E\sigma_{INS}$ ,  $E\sigma_{D513K}$  et  $E\sigma_{D516K}$  ont montré une sensibilité légèrement plus forte à Lpm probablement en changeant directement l'affinité de la Lpm sur son site de liaison dans l'ARNP.



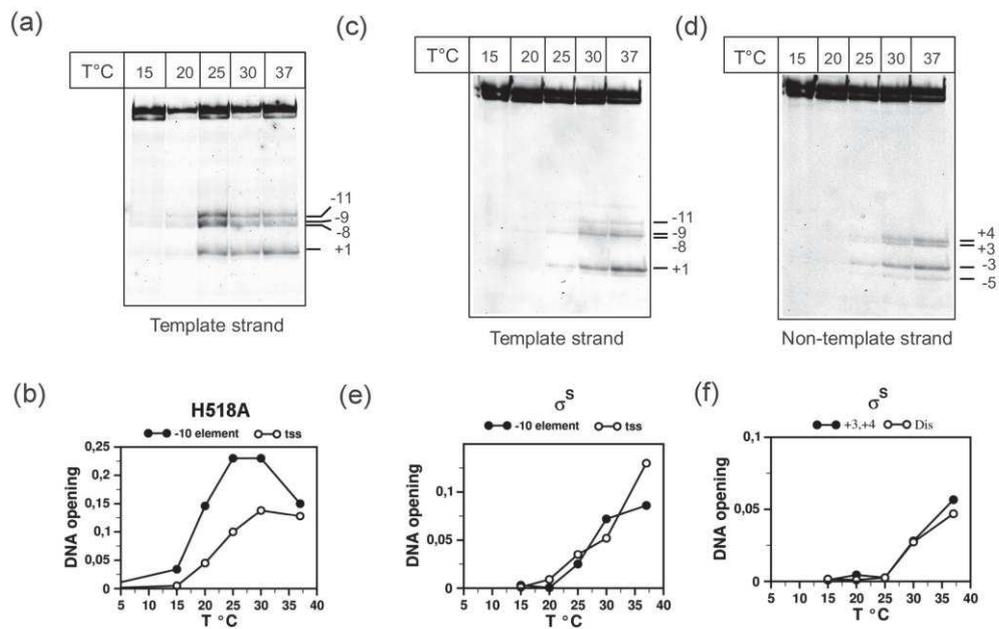
**Figure 32.** Effets des variations de la structure de la sous-unité  $\sigma$  sur la formation du RPo à 37 °C. (a) Structure de la bulle de transcription du promoteur *lacUV5*. Régions  $\sigma$  (gris) et  $\beta'$ -SW2 (blanc). Élément -10 (rectangle). Discriminateur (gris). Thymines oxydées par  $KMnO_4$  (triangles noirs). (b) Footprint  $KMnO_4$  du RPo sur promoteur *lacUV5* portant deux fluorophores cy3 et cy2. Positions des thymines indiquées. (c et d) Quantification de l'expérience (b). Les valeurs représentent la fraction d'ADN dans RPo (a) en présence de 50  $\mu$ M Lpm (d).



**Figure 33.** Effet des mutations de la sous-unité  $\sigma$  sur la formation du RPO. (a) Profil  $KMnO_4$  :  $E\sigma^{70}$  (noir) et  $E\sigma_{D513K}$  (bleu). (b) Footprint  $KMnO_4$  du RPO de  $E\sigma$  avec le promoteur *lacUV5* à différentes températures. (c) quantification des données dans (b).



**Figure 34.** Dépendance à la température de l'ouverture du promoteur *lacUV5* par l'ARNP contenant les différents mutants de  $\sigma$  (a) Footprint KMnO<sub>4</sub> du RPo aux températures indiquées. (b) Quantification des données en (a). Valeurs moyennes et écarts-type de deux expériences indépendantes.



**Figure 35.** Formation du RPo sur le promoteur *lacUV5* par  $E\sigma_{H518A}$  et  $E\sigma^S$ . (a) Footprint KMnO4 du RPo formé par  $E\sigma_{H518A}$  aux températures indiquées. (b) Quantification des bandes du gel (a). (c, d) Footprint KMnO4 du RPo formé par  $E\sigma^S$  sur le brin matrice (c) et sur le brin non matrice (d). (e, f) Quantification des données dans (c) et (d).

## C. Simulations de dynamique moléculaire (DM) et le Docking

Selon nos résultats biochimiques, on peut dire que la région 3.2 peut adopter différentes conformations dépendantes de sa composition en acides aminés. La mobilité de cette région peut être restreinte par les ligands (ADN, ARN, antibiotiques) qui se fixent dans le site actif de l'ARNP. La position de la boucle peut avoir un impact sur la fixation de ces ligands. Afin d'obtenir un nouvel aperçu sur le mécanisme d'inhibition et analyser l'impact des mutations de la région 3.2 sur la flexibilité et la mobilité de la boucle au niveau du site actif de l'ARNP, nous avons réalisé des simulations de DM et le Docking en collaboration avec Dr. L. Chaloin.

### C.I) Simulations de dynamique moléculaire

La superposition des structures cristallographiques de l'holoenzyme de l'ARNP d'*E.coli* (4IGC) et de *Thermus thermophilus* (1IW7) avec celle du complexe de l'ARNP de *Thermus thermophilus* en présence de l'ADN scaffold -10 (4G7O, 4Q4Z) révèle que la boucle de la région 3.2 peut occuper différentes positions.

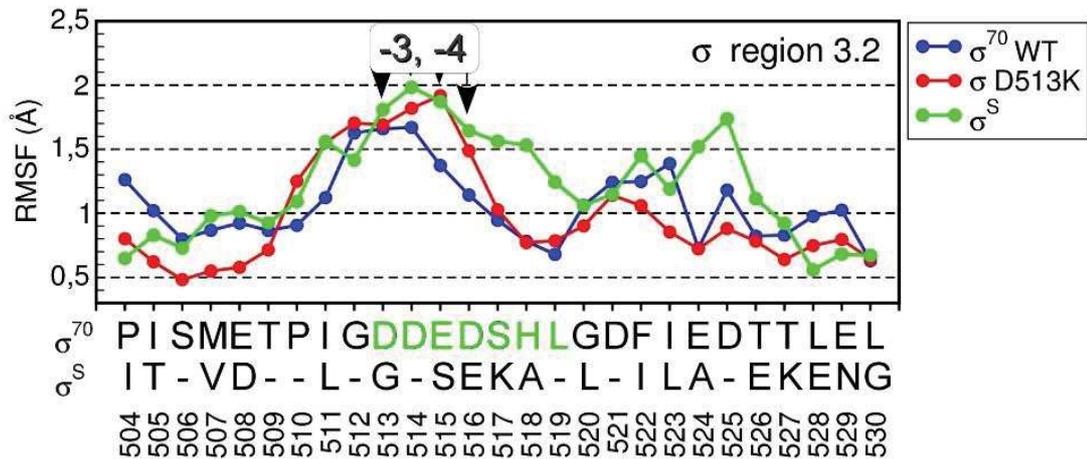
Dans l'holoenzyme, cette boucle est positionnée au niveau du canal de sortie de l'ARN et pourrait entrer en conflit (clash stérique) avec les bases -4,-5,-6 du brin matrice de l'ADN, tandis que dans le complexe de l'ARNP avec le scaffold, la boucle de la région 3.2 est orientée vers l'élément  $\beta'$  switch 2.

Afin d'analyser comment les substitutions dans la région 3.2 de  $\sigma^{70}$  affectent sa conformation et son interaction avec l'élément  $\beta'$  switch 2, nous avons réalisé des simulations de dynamique moléculaire réalisées pendant 10 ns en eau explicite (voir détails dans la partie «Matériels et Méthodes») sur la structure de l'holoenzyme d'*E.coli* (4IGC) contenant le  $\sigma^{70}$  sauvage, puis sur deux mutants : l'un portant la substitution D513K et le second portant les substitutions des résidus 504 à 530 du  $\sigma^S$  (**Figure 36, 37, 38 et 39**).

Durant ces simulations, le système compte plus de 400 000 atomes, ce qui explique la durée des simulations de dynamique moléculaire qui est relativement courte. Il est à noter que des simulations plus longues sont nécessaires afin d'avoir un parfait échantillonnage de l'espace conformationnel.

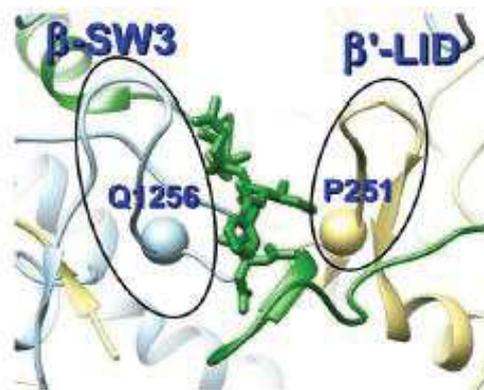
Les résidus de l'élément  $\beta'$  switch 2 de la position 330-346 ont été modélisés selon la structure de l'holoenzyme de *Thermus thermophilus* (4G7O). Ces simulations ont montré que deux parties de la boucle de  $\sigma^{70}$  sauvage possèdent une forte flexibilité :

- les résidus (DDED) de la position 513-516 chargés négativement contactent les bases -4, -3 de l'ADN et l'élément  $\beta'$  switch 2 (Basu et al., 2014; Zhang et al., 2012)
- les résidus de la position 519-525 qui se trouvent au niveau de l'entrée du canal de sortie de l'ARN, contactent les résidus  $\beta'$ -SW3 1250-1254 et  $\beta'$ -LID 253-255



**Figure 36.** Fluctuations des atomes C $\alpha$  des résidus 504 à 530 de la région 3.2

On peut conclure que la conformation de la région 3.2 pourrait affecter les fonctions des éléments  $\beta'$  switch 2,  $\beta$  switch 3 et  $\beta'$  lid dans lesquels les mutations ont conféré des résistances à la lipiarmycine (Gualtieri et al., 2009) (**Figure 37**).

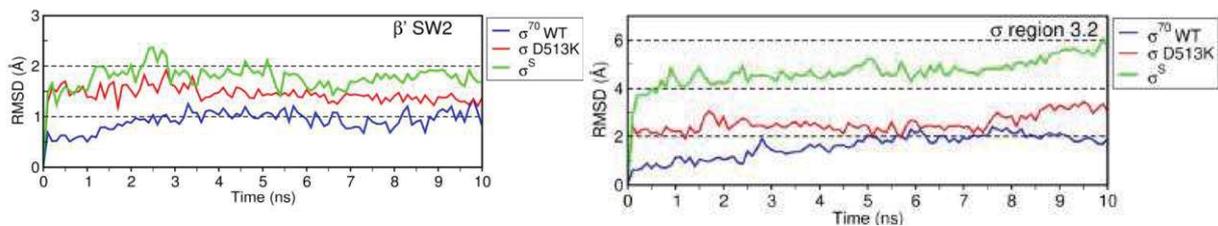


**Figure 37.** Interaction de la région 3.2 (vert) avec le résidu Q1256 du  $\beta$ -SW3 (bleu clair) et le résidu P251 du  $\beta'$ -LID (jaune) dont les mutations ont conféré une résistance à la lipiarmycine (Gualtieri et al., 2009).

La substitution D513K n'affecte pas la flexibilité globale de la région 3.2. Ceci est confirmé par les résultats biochimiques qui ont montré que cette substitution n'a aucun effet sur la formation du complexe ouvert et ont montré une faible inhibition en présence de la Lpm.

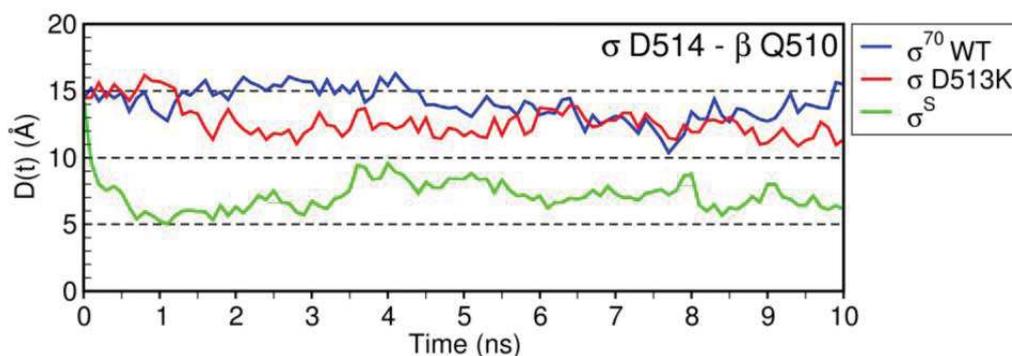
La région 3.2 de  $\sigma^S$  a montré une augmentation de la flexibilité aux positions 517-519 et 524, 525 pouvant avoir un effet sur la mobilité et la conformation de toute la région.

En effet, la comparaison des changements de distance (RMSD) au cours de la simulation de DM sur 10 ns a révélé que la région 3.2 de  $\sigma^{70}$  ainsi que celle du mutant  $\sigma_{D513K}$  ont un comportement semblable avec un déplacement moyen des atomes C $\alpha$  de 2-3 Å ; alors que la région 3.2 de  $\sigma^S$  a montré une mobilité plus importante avec un déplacement des atomes C $\alpha$  jusqu'à 6 Å. A la fin de la simulation de DM, la fluctuation de la boucle de la région 3.2 de  $\sigma^S$  et celle de  $\sigma_{D513K}$  est supérieure à celle de  $\sigma^{70}$  (**Figure 38**).



**Figure 38.** Déviation spatiale au cours de la simulation des atomes C $\alpha$  de  $\beta'$ -SW2 et de la région 3.2 du facteur sigma comme indicateur de la stabilité conformationnelle.

L'analyse des changements de distance  $D(t)$  entre le résidu D514 dans la région 3.2 de  $\sigma^S$  et le core de l'ARNP révèle que la boucle s'éloigne de 10 Å du résidu R337 de l'élément  $\beta'$  switch 2 et s'approche du résidu Q 510 de  $\beta$  lobe 1. En revanche, le changement de distance  $D(t)$  de  $\sigma_{D513K}$  est proche de celui de  $\sigma^{70}$  (**Figure 39**).



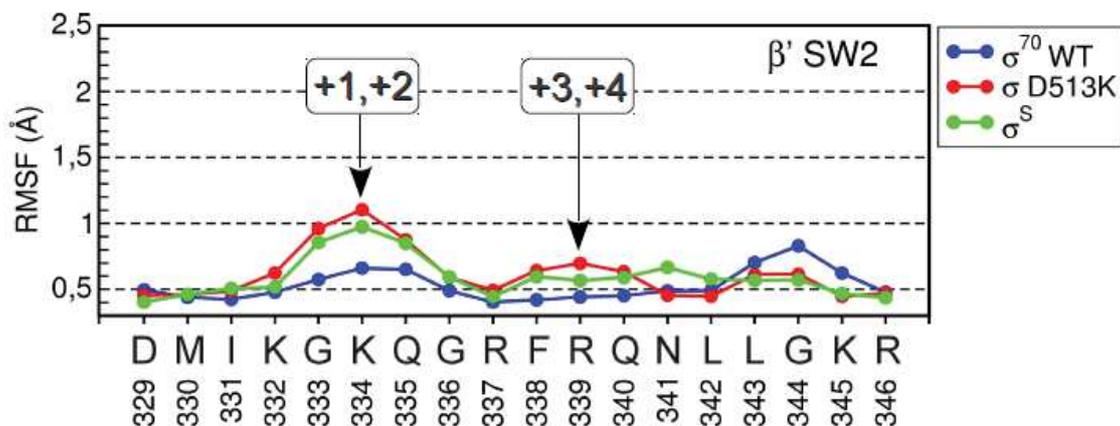
**Figure 39.** Changements de distance  $D(t)$  entre les atomes C $\alpha$  du résidu D514 dans la région 3.2 et du résidu Q510 du  $\beta$  lobe

L'élément  $\beta'$  switch 2 (**résidus S326 - R346**) est un partenaire fonctionnel de la boucle de la région 3.2. Il interagit avec les bases -2, -1, +1, +2 du brin matrice de l'ADN.

Cet élément montre moins de flexibilité que la boucle de la région 3.2 (**Figure 40**). La flexibilité de ses résidus 333 à 335 et 344 a été légèrement affectée par les substitutions au niveau de la boucle de la région 3.2 suggérant l'existence d'interactions entre les deux régions.

La dynamique de  $\beta'$  switch 2 avec soit  $\sigma_{D513K}$ , soit  $\sigma^S$ , montre une augmentation de la mobilité du résidu K334. Ce résidu contacte les bases +1 / +2 de l'ADN. Ceci est confirmé par les résultats biochimiques qui ont montré une augmentation de l'accessibilité de  $KMnO_4$  à la thymine en position +1 dans la formation du complexe ouvert contenant les ARNPs avec  $\sigma_{D513K}$  et  $\sigma^S$  (**Figure 31 et 35c, e**).

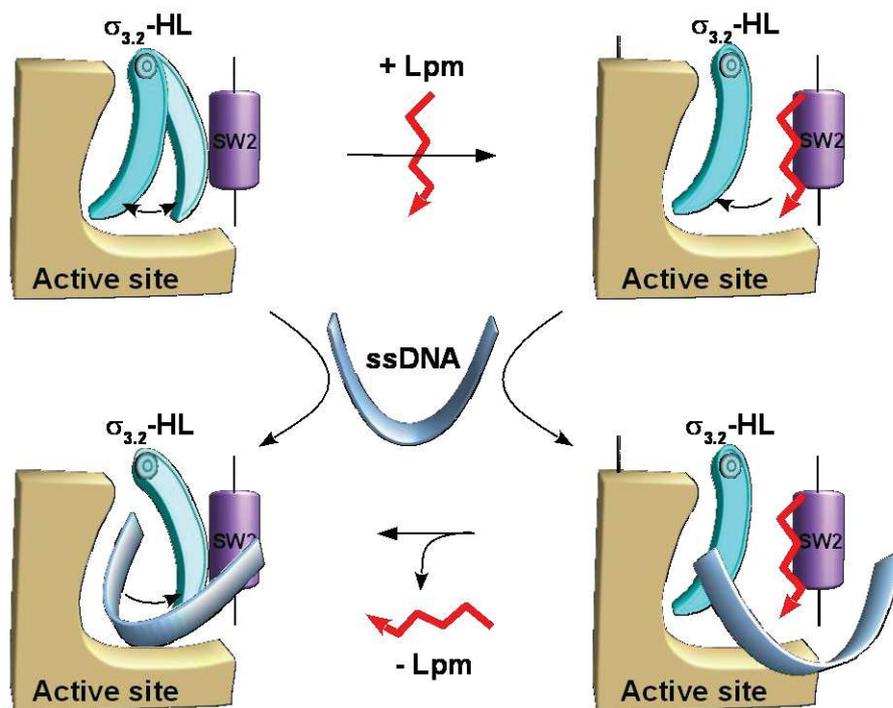
Ces résultats suggèrent que la mobilité conformationnelle de la boucle de la région 3.2 dépend fortement de la composition de sa séquence et diffère entre le sigma principal et le sigma alternatif.



**Figure 40.** Fluctuations des atomes  $C\alpha$  de  $\beta'$ -SW2.

Les résultats des simulations de dynamique moléculaire ont fourni une explication pour les substitutions aussi bien que pour la délétion dans la région 3.2 qui ont produit des effets semblables sur la transcription *in vitro* et sur la sensibilité à la Lpm.

La suppression de la région 3.2 pourraient affecter la fonction de l'élément  $\beta'$  switch 2 et l'organisation de la bulle de transcription avec un effet important sur la stabilité du complexe ouvert, sur la synthèse des produits abortifs et sur l'inhibition par la Lpm (**Figure 41**)



**Figure 41.** Mécanisme de compétition au cours de l'inhibition par la Lpm et rôle de la boucle de la région 3.2 (vert) interférant entre le brin matrice d'ADN (bleu) et Lpm (rouge) au niveau du site actif de l'ARNP.

## C.II) Docking

Afin d'obtenir un nouvel aperçu sur le mécanisme d'inhibition et sur le mode de liaison, nous avons réalisé des tests d'amarrage moléculaire «docking» de la lipiarmycine dans le site actif de l'ARNP en utilisant la même structure que celle utilisée en dynamique moléculaire. Le docking a été réalisé avec les logiciels GOLD, CCDC (Jones 372 et al., 1997) et PLANTS (Korb et al., 2009) utilisant deux algorithmes différents pour la recherche de solutions (ou plus communément appelé pose de docking). La procédure de docking est décrite dans la partie «Matériels et Méthodes».

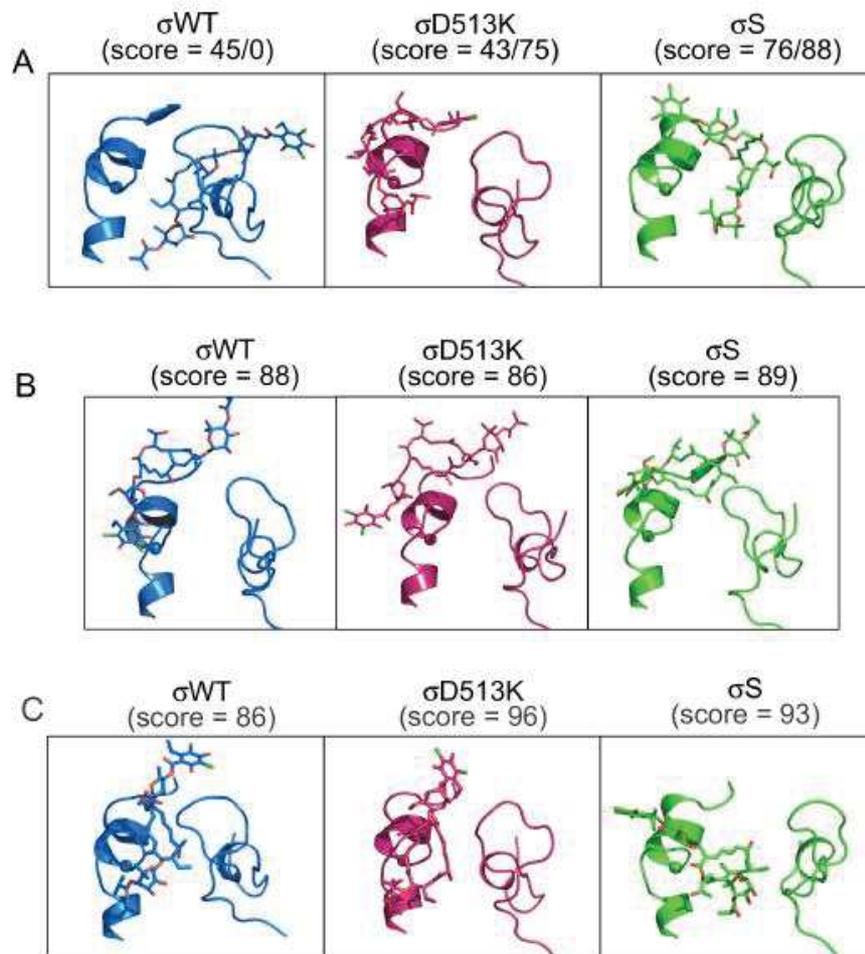
Le site de liaison putatif de la Lpm a été défini à partir de la cartographie des mutants spontanés *in vivo* conférant la résistance à l'antibiotique (**Figure 24B**). Parmi les résidus impliqués dans la résistance, nous avons choisi le résidu R337 de l'élément  $\beta'$  switch 2 comme centre de recherche pour le docking (sphère de 15Å de rayon autour de ce résidu). Le mode de fixation de la Lpm sur l'ARNP est prédit par recherche des meilleures solutions avec 50 séries d'algorithme génétique. Les solutions sont ensuite classées par une fonction de score qui représente une estimation de l'affinité théorique de liaison.

En effet, ce résidu R337 est probablement impliqué dans le site de liaison de la Lpm parce que sa substitution a supprimé l'inhibition par Lpm en l'absence de  $\sigma^{70}$  (Tupin et al., 2010a).

Tout d'abord, nous avons utilisé les structures de l'ARNP issues soit du début, soit de la fin de la simulation de dynamique moléculaire. Avec  $\sigma^{70}$  le docking a généré des solutions mais de très faible score (proche de zéro) après les simulations de DM, ce qui montre une fixation de très faible affinité dans ces conditions. Avec  $\sigma_{D513K}$ , la Lpm présente un score légèrement plus élevé et le score le plus élevé a été obtenu avec le facteur d'échange  $\sigma^S$  (**Figure 42A**). Excepté pour  $\sigma^S$ , la fixation de la Lpm n'est pas favorable dans ce site de par les contraintes stériques existantes entre la région  $\sigma$  et le  $\beta$  switch 2. Aussi, la conformation de la région 3.2 affecte les résultats du docking. Cela confirme que la mobilité de cette région peut avoir un impact sur la fixation de la Lpm.

Quand le docking est réalisé avec plus de flexibilité (sur des conformations issues de la dynamique) au niveau des résidus (K334 et Q335) de l'élément  $\beta'$  switch 2 et dans la région 3.2 (D513, D514, E515), les scores sont significativement plus grands, ce qui indique une fixation de plus forte affinité que précédemment et nous avons trouvé un site commun de fixation de la Lpm dans  $E\sigma^{70}$ , dans  $E\sigma_{D513K}$  et dans  $E\sigma^S$  (**Figure 42B, C**).

Dans tous les cas, le site de liaison de la Lpm a été placé en dehors de la région 3.2, et la sous-unité sigma n'est pas nécessaire à la fixation de la Lpm. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'interaction entre la Lpm et la région 3.2 de  $\sigma^{70}$  pourrait affecter l'affinité de la Lpm.

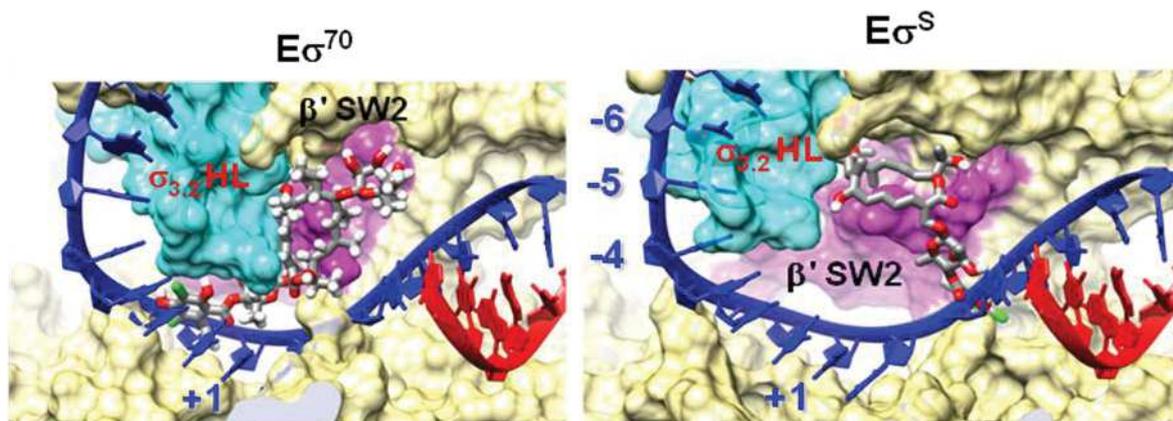


**Figure 42.** Docking de la Lpm dans la structure de l'ARNP d'*E.coli* avec le programme GOLD.

A. Docking de l'ARNP contenant  $\sigma^{70}$  (bleu),  $\sigma^{D513K}$  (rouge),  $\sigma^S$  (vert). B et C Docking réalisé après dynamique moléculaire en incluant de la flexibilité pour les chaînes latérales des résidus (K334 et Q335) du  $\beta'$  switch 2 et celles de la région 3.2 (D513, D514, E515).

Les résultats du docking nous indiquent que la mobilité de la boucle de la région 3.2 pourrait avoir un impact sur la fixation de la Lpm. Nous avons conclu que cette boucle pourrait interférer avec la fixation de la Lpm dans le cas d' $E\sigma^{70}$ , mais pas dans les cas d' $E\sigma_{\Delta 3.2}$  et  $E\sigma^S$ .

La modélisation de l'ADN -10-Scaffold (4G7H) avec la structure de l'ARNP d'*E.coli* contenant la Lpm a révélé que cette molécule occulte le passage de l'ADN simple brin entre les positions -3 et +4 (**Figure 43**). En outre, la boucle de la région 3.2 du  $\sigma^S$  après les simulations de DM, se heurte à l'ADN simple brin de la position -4 à -7 et devrait être déplacée vers le site de liaison de la Lpm pour permettre la fixation de l'ADN. Donc, la fixation de la Lpm n'est pas compatible avec la fixation de l'ADN simple brin. Ceci est en accord avec les résultats biochimiques qui montrent que la Lpm n'inhibe pas l'ARNP si elle est ajoutée après la formation du RPo.



**Figure 43.** Modélisations structurales des interactions entre  $E\sigma^{70}$ ,  $E\sigma^S$ , Lpm (gris rouge) et le brin matrice de l'ADN au niveau du site actif (bleu).

## D. Conclusions

Ces travaux ont permis de caractériser le mécanisme moléculaire de la fusion du promoteur et de déterminer le rôle de la région 3.2 et de la région 1.2 dans la résistance à la lipiarmycine.

Ils ont permis d'établir plusieurs conclusions majeures :

- La délétion de la région 3.2 et la substitution E116G dans la région 1.2 affectent allostériquement l'action de la lipiarmycine en compromettant la formation de complexe ouvert.
- La région 3.2 du facteur  $\sigma^S$  et du  $\sigma_{INS}$  peut adopter une conformation différente de celle du  $\sigma^{70}$ . Dans ce cas, elle n'interfère pas avec la fixation de la Lpm et /ou augmente l'affinité de la Lpm à l'ARNP.
- Ces résultats suggèrent que la conformation et la mobilité de la région 3.2 dépendent fortement de sa séquence qui varie selon le sigma principal et selon le sigma alternatif
- Les mutations dans la région 3.2 changent son état conformationnel et sa mobilité
- La conformation de la région 3.2 impacte l'ouverture du promoteur et la séparation de l'ARNP du promoteur
- L'ouverture de l'ADN du promoteur est une cible pour la régulation génétique et pour les antibiotiques
- Les régions du facteur sigma impliqués dans l'ouverture de l'ADN inhibent l'action de l'antibiotique

Les résultats de docking indiquent que cette région 3.2 doit être très mobile (flexible) pour favoriser la fixation de la Lpm dans le site actif. Avec des structures issues de la cristallographie et sans flexibilité des chaînes latérales, le docking de la Lpm est très difficile (faible score) du fait des contraintes stériques. Aussi, les mutations dans cette région qui vont augmenter la flexibilité permettront d'augmenter l'affinité de la Lpm pour sa cible, comme cela a été observé pour le facteur  $\sigma^S$ .

Le docking suggère que Lpm rentre en compétition avec le brin matrice de l'ADN lors de la fixation au niveau du site actif.



## Regions 1.2 and 3.2 of the RNA Polymerase $\sigma$ Subunit Promote DNA Melting and Attenuate Action of the Antibiotic Lipiarmycin

Zakia Morichaud, Laurent Chaloin and Konstantin Brodolin

CNRS – FRE3689 Université de Montpellier, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier, France

Correspondence to Konstantin Brodolin: [konstantin.brodolin@inserm.fr](mailto:konstantin.brodolin@inserm.fr)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2015.12.017>

Edited by K. Severinov

### Abstract

Initiation of RNA synthesis by bacterial RNA polymerase (RNAP) requires melting of promoter DNA, which is nucleated by the  $\sigma$  subunit during formation of the “open” promoter complex ( $RP_o$ ). The antibiotic lipiarmycin (Lpm) inhibits promoter melting by blocking access of the template DNA strand to the RNAP active-site cleft. Here we show that *Escherichia coli*/RNAP holoenzymes containing either housekeeping  $\sigma^{70}$ , with a deletion in the region 3.2, or the stationary phase  $\sigma^S$  subunits exhibited hypersensitivity to Lpm and increased cold sensitivity of  $RP_o$  formation. Similar effects were produced by mutation located ~60 Å away from the Lpm binding site within  $\sigma^{70}$  region 1.2, controlling -10 promoter element recognition. Our data suggested that template strand single-stranded DNA competes with Lpm for binding to RNAP and that  $\sigma^{70}$  regions 1.2 and 3.2 attenuate Lpm action by promoting DNA duplex opening.

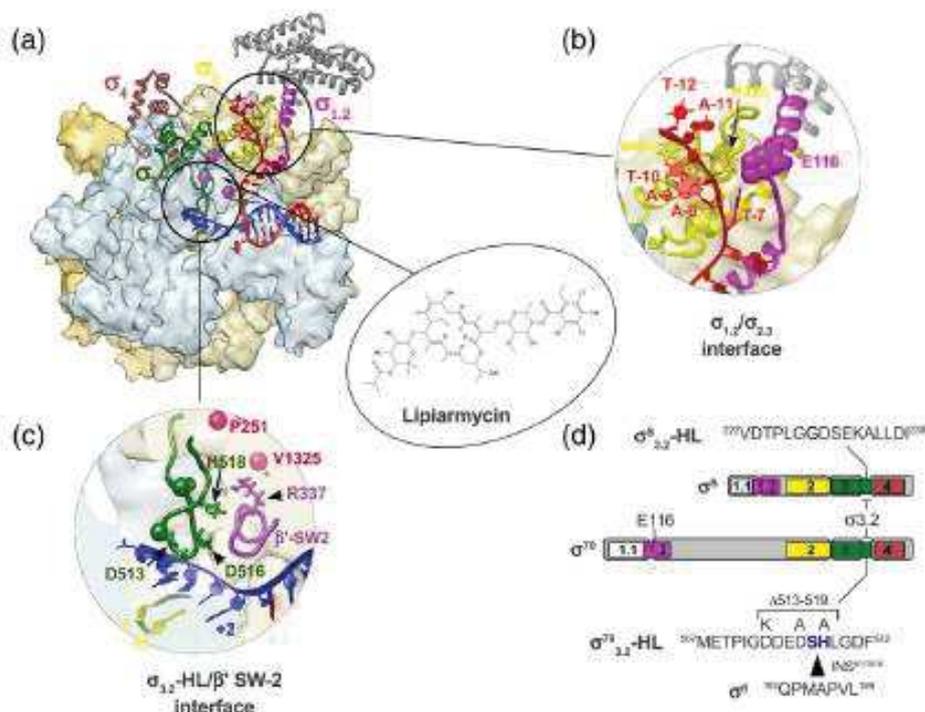
© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

Bacterial DNA-dependent RNA polymerase (RNAP) consists of a catalytic core ( $\alpha_2\beta\beta'\omega$  subunits) and an auxiliary  $\sigma$  subunit required for promoter recognition, promoter DNA unwinding and *de novo* initiation of RNA synthesis. In *Escherichia coli*, the housekeeping  $\sigma^{70}$  subunit controls expression of the majority of the genes during exponential growth, while  $\sigma^S$  becomes active during the stationary phase and stress response [1]. During transcription initiation, RNAP first forms an inactive “closed complex” ( $RP_c$ ) with the double-stranded promoter DNA, which isomerizes to the catalytically active “open complex” ( $RP_o$ ) through several transient intermediates (reviewed in Ref. [2]). In  $RP_o$ , ~13 bp of the promoter DNA around the transcription start site is unwound forming a transcription bubble, and template single-stranded DNA (ssDNA) is accessible for the initiation of RNA synthesis. During  $RP_o$  formation, the  $\sigma$  subunit domains 2 ( $\sigma_2$ ) and 4 ( $\sigma_4$ ) recognize the -10 and -35 elements of the promoter, respectively, and  $\sigma_2$  nucleates DNA melting at the -10 element by trapping the T<sub>-11</sub> and T<sub>-7</sub> bases of the non-template DNA strand flipping out of the DNA duplex [3]. After DNA strand separation, the

template DNA strand fits into the active site, while the DNA duplex downstream of the transcription start site of the promoter binds to the channel formed by the RNAP  $\beta'$  and  $\beta$  subunits pincers ( $\beta'$  jaw/clamp and  $\beta$  lobe domains). These interactions established in  $RP_o$  persist in the elongation complex after promoter escape [4–6].

In addition to the interactions of the  $\sigma_2$  and  $\sigma_4$  domains with the -10 and -35 promoter consensus elements, the  $\sigma$  subunit regions 1.2 ( $\sigma_{1.2}$ ) and 3.2 ( $\sigma_{3.2}$ ) make ex-consensus contacts with the promoter non-template and template ssDNA strands, respectively (Fig. 1). Region 1.2 contacts the “discriminator” sequence located downstream of the -10 element [7] and modulates the -10 element binding allosterically [8]. The region 3.2 hairpin loop ( $\sigma_{3.2}$ -HL or “ $\sigma_{3.2}$ ”-finger”), analogous to the eukaryotic TFIIIB B-reader loop (also called “B-finger”) [9,10], protrudes toward the catalytic site, and its residues (D514, D516, S517 and F522) interact with the template ssDNA at positions -4 and -3 [4,5] (Fig. 1b and c). It has been proposed that  $\sigma$  region 3.2 acts in concert with the  $\beta'$  switch 2 region  $\beta'$ -SW2 in positioning of the template ssDNA at the active site, which occurs during the formation of  $RP_o$  [11,12]. The amino acid sequences of  $\sigma$  region 3.2 are highly conserved



**Fig. 1.** Positioning of the  $\sigma^{70}$  subunit mutations in the structure of RNAP. (a) Structural model of the *E. coli*  $\sigma^{70}$ -RNAP holoenzyme (4IGC) in complex with the -10 scaffold DNA (from 4G7O) (blue, template strand; red, non-template strand) and 2-mer RNA primer annealed to positions -1 and +1 (yellow). Core RNAP is shown as semitransparent molecular surface:  $\beta'$ , khaki;  $\beta$ , light blue;  $\alpha$ , yellow.  $\sigma^{70}$  is shown as a ribbon model. Region 1.2, magenta;  $\sigma$  region 2, yellow;  $\sigma$  region 3, dark green;  $\sigma$  region 4, brown.  $\sigma$  Region 1.1 was removed for clarity. The C $^{\alpha}$  atoms of the residues implicated in Lpm resistance ( $\beta$ P251,  $\beta$ R99,  $\beta$ R337,  $\beta$ V1325 and  $\beta$ Q1256 [25]) are depicted by violet spheres. (b) Interface between  $\sigma$  region 3.2 (green ribbons),  $\beta'$ -SW2 (purple ribbons) and template strand ssDNA. Residue R337 in  $\beta'$ -SW2 and residues D513, D516 and H518 in region 3.2 are shown as stick models. The C $^{\alpha}$  atoms of the residues 512 and 520, located at the boundaries of the deletion  $\Delta 513-519$ , are shown as CPK models. (c) Interface between  $\sigma$  regions 1.2 and 2.3 and the -10 element non-template ssDNA. Color codes are as in (a). The conserved tryptophan residues (W433 and W434) and residue K426 in region 2.3 are shown as stick models. The E116 residue is shown as space-filled model. (d) Schematic presentation of the  $\sigma^{70}$  and  $\sigma^S$  subunits with the evolutionarily conserved regions 1-4 color coded as in (a). The sequence of the  $\sigma_{3.2}$ -HL from  $\sigma^{70}$  is shown with the positions of the substitutions studied in this work (D513K, D516A and H518A) underlined. Position of the deletion  $\Delta 513-519$  is indicated by square bracket. Sequence of the insertion (INS<sup>517/518</sup>) comprising amino acids 193-199 from the  $\sigma^H$  subunit is shown beneath. The insertion site is indicated by black triangle and the amino acids are shown in boldface.

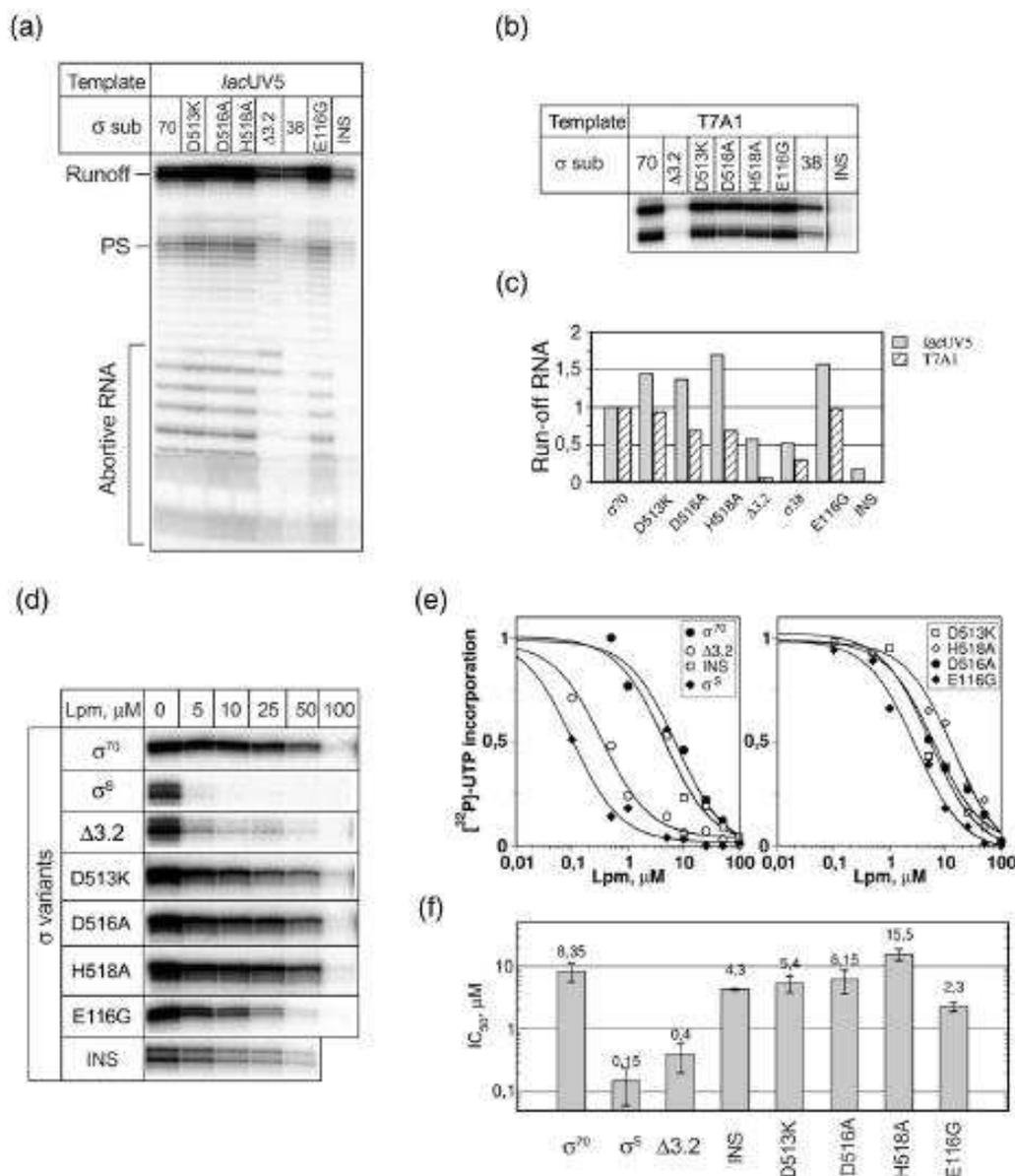
between group I  $\sigma$  subunits, while they are divergent between alternative  $\sigma$  subunits (Fig. S1a). Noticeably, the  $\sigma_{3.2}$ -HL of the heat shock  $\sigma^H$  subunit harbors an insertion, while the group IV  $\sigma$  subunits lack  $\sigma_{3.2}$ -HL.

A group of antibiotics, including myxopyronin (Myx) and liplarmycin (Lpm, also known as tiacumicin B or under the trade names fidaxomicin and Difcid), targets the RNAP "switch" regions and inhibits distinct steps in isomerization from  $RP_c$  to  $RP_o$  [13-15]. It has been demonstrated that Lpm fully inhibits the formation of transcription bubbles [12,13], while Myx inhibits opening of the transcription start site [16]. However, the precise mechanism of inhibition remains unclear. Lpm has been suggested to act by blocking the fitting of the template

DNA into the RNAP active-site cleft [12], while Myx prevents RNAP clamp opening [17] or stabilizes non-functional, refolded, conformation of  $\beta'$ -SW2 [16]. The role of the  $\sigma$  subunit in RNAP inhibition by SW2-targeting antibiotics has not been explored thoroughly.  $\sigma^{70}$  subunit region 3.2 is positioned close to the cluster of mutations conferring resistance to Lpm, and it interacts with the clamp elements:  $\beta'$ -SW2 and  $\beta'$ -Lid [12,14,15] (Fig. 1b). Owing to its position on the RNAP structure,  $\sigma$  region 3.2 may (1) directly interfere with Lpm binding and (2) allosterically modify the Lpm binding site on core RNAP or produce both effects. Tupin *et al.* concluded that the deletion of amino acids 513-519 in  $\sigma^{70}$  region 3.2 conferred resistance to Lpm [12]. Here we

revised this assertion and found it to be incorrect in agreement with the reports from other groups [13,15] (see below and Supplemental Data and Fig. S1). We

used site-directed mutagenesis and biochemical assays to explore the role of the  $\sigma^{70}$  subunit in the inhibition of RNAP by Lpm. Our study demonstrated



**Fig. 2.** Effect of mutations in the  $\sigma^{70}$  subunit on transcription and the sensitivity of RNAP to Lpm. (a and b) Transcriptional activity of the RNAPs containing the indicated  $\sigma$  subunit variants. [ $^{32}$ P]RNA products synthesized on the *lacUV5* (a) and *T7A1* (b) promoters in the single-round run-off transcription assay. (c) Quantification of the run-off [ $^{32}$ P]RNA products from the gels shown in (a) and (b). (d) Run-off [ $^{32}$ P]RNA products synthesized on *lacUV5* promoter by RNAPs containing indicated  $\sigma$  subunits in the presence of increasing concentrations of Lpm. (e) Quantification of the run-off [ $^{32}$ P]RNA products shown in (a). Values were normalized to the quantity of RNA synthesized without Lpm. (f)  $IC_{50}$  values calculated on the bases of the gels shown in (d). Mean values and standard deviations of three independent experiments are shown.

that the structure of the  $\sigma$  subunit regions 1.2 and 3.2 strongly affected the ability of the drug to inhibit  $RP_o$  formation. Furthermore, Lpm displayed high selectivity for RNAP containing stationary phase  $\sigma^S$ , suggesting that antibiotics could play a role in the growth phase-specific regulation of transcription.

## Results

### The $\sigma^{70}$ region 3.2 hairpin loop is not required for *de novo* initiation of RNA synthesis on the *lacUV5* promoter

To explore systematically how changes in the structure of the  $\sigma$  subunit could affect the efficiency of RNAP inhibition by Lpm, we used a panel of  $\sigma^{70}$  mutants and the stationary phase  $\sigma^S$  subunit, which is highly homologous to  $\sigma^{70}$  and recognizes identical -10 and -35 promoter consensus elements [1,18]. We constructed  $\sigma^{70}$  with the deletion of amino acids at positions 513–519 in the region 3.2 hairpin loop ( $\sigma_{\Delta 3.2}$ ) and with the insertion of seven amino acids, corresponding to residues 193–199 of heat shock  $\sigma^{H}$  between  $\sigma^{70}$  positions 517 and 518 ( $\sigma_{INS}$ ) (Fig. 1d). The insertion might disrupt or modify the interaction between  $\beta'$ -SW2 and  $\sigma_{3.2}$ -HL and/or create steric hindrance of Lpm binding. Also,  $\sigma^{70}$  subunits, containing substitutions D513K ( $\sigma_{D513K}$ ), D516A ( $\sigma_{D516A}$ ) and H518A ( $\sigma_{H518A}$ ) in  $\sigma_{3.2}$ -HL, were constructed. These substitutions could change the environment of the Lpm binding site by disrupting/creating new contacts with core RNAP and template ssDNA (Fig. 1b) [5,19,20]. In addition, to explore whether changes in the regions of  $\sigma^{70}$  distant from the putative Lpm binding site could affect the antibiotic activity, we constructed substitution E116G in  $\sigma$  region 1.2 ( $\sigma_{E116G}$ ), which is implicated in  $RP_o$  formation [5,21] (Fig. 1c and d).

The ability of the purified  $\sigma$  subunit variants to support the *de novo* initiation of RNA synthesis was tested in a single-round run-off transcription assay on the *lacUV5* and T7A1 promoters (Fig. 2a and b). The activity of  $\sigma_{E116G}$  was the same or greater than the activity of wild-type  $\sigma^{70}$ , suggesting that E116 is not essential for the initiation of RNA synthesis. This finding differed from previous reports, showing that substitutions E116K and E116A either completely blocked transcription from the promoter template [21] or reduced it to 40% of the wild-type RNAP on the synthetic scaffold template [5]. The discrepancy in results might have accounted for the identity of the substituting residues and the configuration of DNA templates.

RNAPs containing  $\sigma$  subunits with single amino acid substitutions in  $\sigma$  region 3.2 showed no defects in RNA synthesis and only minor differences in the patterns of abortive RNAs (Fig. 2a). RNAP contain-

ing the  $\sigma_{\Delta 3.2}$  subunit was almost inactive in the *de novo* initiation of RNA synthesis (7% of residual activity) on the T7A1 promoter at low NTP concentrations (25  $\mu$ M), in agreement with previous reports [22,23]. Strikingly,  $\sigma_{\Delta 3.2}$ -RNAP exhibited greater activity in run-off RNA synthesis on the *lacUV5* promoter (50% of wild-type  $\sigma^{70}$  activity) and produced almost the same amount of 3-mer abortive RNA product as the wild-type RNAP (Fig. S2a). Comparison of the ratios of abortive to run-off RNA products revealed that substitutions D513K, H518A and E116G increased efficiency of promoter escape. This result suggested that  $\sigma_{3.2}$ -HL is not required for the priming of RNA synthesis and that the effect of  $\sigma_{\Delta 3.2}$ -HL deletion on *de novo* initiation depends on the promoter DNA sequence. The most dramatic defect in transcription was introduced by the insertion ( $\sigma_{INS}$ ), which fully abolished transcription from the T7A1 promoter and showed significantly reduced activity on the *lacUV5* promoter (Fig. 2a and b). Based on these results, we hypothesized that it was the overall conformation of  $\sigma$  region 3.2, but not the specific contacts formed by the particular residues, that played a critical role in  $\sigma$  function.

### The stationary phase $\sigma^S$ mimics properties of the mutant $\sigma^{70}$ with changes in region 3.2

The group II stationary phase  $\sigma^S$  harbors a "full-length"  $\sigma_{3.2}$ -HL that is divergent from  $\sigma^{70}$  in 8 of 16 positions (Fig. 1d and Fig. S1a). In the transcription assay performed on *lacUV5* and A1 promoters,  $\sigma^S$ -RNAP produced diminished amounts of run-off products (Fig. 2a and b). Furthermore, the pattern of RNA products observed during transcription by  $\sigma^S$ -RNAP on the *lacUV5* promoter was strikingly similar to the patterns observed with the mutant RNAPs containing  $\sigma_{\Delta 3.2}$  and  $\sigma_{INS}$ , and the pattern was characterized by an almost complete lack of the intermediate size abortive RNAs (Fig. S2b). The latter result was surprising because the origin of abortive RNAs has usually been attributed to the steric clash between growing RNA chains and  $\sigma_{3.2}$ -HL [24], which should occur in both,  $\sigma^S$  and  $\sigma_{INS}$ . The only rational explanation for the above facts would be that regions 3.2 of  $\sigma^S$  and  $\sigma_{INS}$  did not interfere with extension of the nascent RNA products because their conformation differed from the conformation of region 3.2 in the  $\sigma^{70}$  subunit.

### RNAPs containing $\sigma^S$ and $\sigma_{\Delta 3.2}$ exhibited hypersensitivity to Lpm

To assess the impact of the  $\sigma$  structure on the inhibitory activity of Lpm, we tested RNAPs containing the above-described  $\sigma$  subunit variants in a single-round run-off transcription assay on the *lacUV5* promoter in the presence of increasing concentrations of the antibiotic (Fig. 2d). The

RNAP containing  $\sigma^{70}$  tolerated micromolar concentrations of Lpm ( $IC_{50} \sim 8 \mu\text{M}$ ; Table S1 and Fig. 2e and f), while the RNAP containing  $\sigma^S$  exhibited  $\sim 50$ -fold greater sensitivity and was inhibited at nanomolar concentrations of Lpm ( $IC_{50} \sim 150 \text{ nM}$ ). The  $\sigma_{\Delta 3.2}$  subunit also increased the sensitivity of RNAP to Lpm by  $\sim 20$ -fold ( $IC_{50} \sim 0.4 \mu\text{M}$ ), while RNAP containing  $\sigma_{1NS}$  displayed only 2-fold greater sensitivity ( $IC_{50} \sim 4.3 \mu\text{M}$ ). None of the single amino acid substitutions in  $\sigma$  region 3.2 produced strong effects on Lpm inhibition. Thus, a marginal increase in sensitivity was observed with  $\sigma_{D513K}$  ( $IC_{50} \sim 5.4 \mu\text{M}$ ), while almost no change was observed with  $\sigma_{D516A}$  (Fig. 2e and f). Interestingly, RNAP containing  $\sigma^{70}$  with substitution H518A, which could disrupt H518 interaction with the  $\beta$ '-SW2, was  $\sim 2$ -fold more resistant to Lpm. Taken together, the effects of  $\sigma$  region 3.2 mutations on transcription and Lpm inhibition were consistent with two mechanisms: (1) region 3.2 in  $\sigma^S$  and mutant  $\sigma^{70}$  could adopt conformation different from that in wild-type  $\sigma^{70}$  and that did not interfere with Lpm binding or increase the affinity of Lpm for RNAP and (2) changes in region 3.2 indirectly affected Lpm inhibition by changing RNAP proficiency in  $RP_o$  formation. Finally, a combination of both mechanisms is possible.

#### Substitution E116G in $\sigma^{70}$ region 1.2 increased the sensitivity of RNAP to Lpm

The evolutionarily conserved E116 residue in  $\sigma^{70}$  region 1.2 is located  $\sim 60 \text{ \AA}$  away from the Lpm binding site inferred from the mapping of the Lpm<sup>R</sup> mutations [25] (Fig. 1a and c). Surprisingly, in run-off transcription assay, the mutant  $\sigma_{E116G}$ -RNAP exhibited 4-fold greater sensitivity to Lpm ( $IC_{50} \sim 2.3 \mu\text{M}$ ) than the wild-type RNAP (Fig. 2f and g). Note that the transcriptional activity of the mutant  $\sigma_{E116G}$ -RNAP was the same as the activity of the wild-type enzyme (Fig. 2). Assuming that the Lpm binding site is positioned in the RNAP active-site cleft, the substitution of E116G could not directly affect the antibiotic binding, and its effect on inhibition should be indirect (probably allosteric). Because  $\sigma^{70}$  region 1.2 has been implicated in  $RP_o$  formation [7,8,21,26], the E116G mutation likely attenuated Lpm action by compromising the isomerization from  $RP_o$  to  $RP_c$ . Thus, we proposed that the strong  $\sigma$ -dependent variations in RNAP sensitivity to Lpm may be related to the promoter binding/melting activities of  $\sigma^{70}$ , which are essential for  $RP_o$  formation on the double-stranded promoter DNA template.

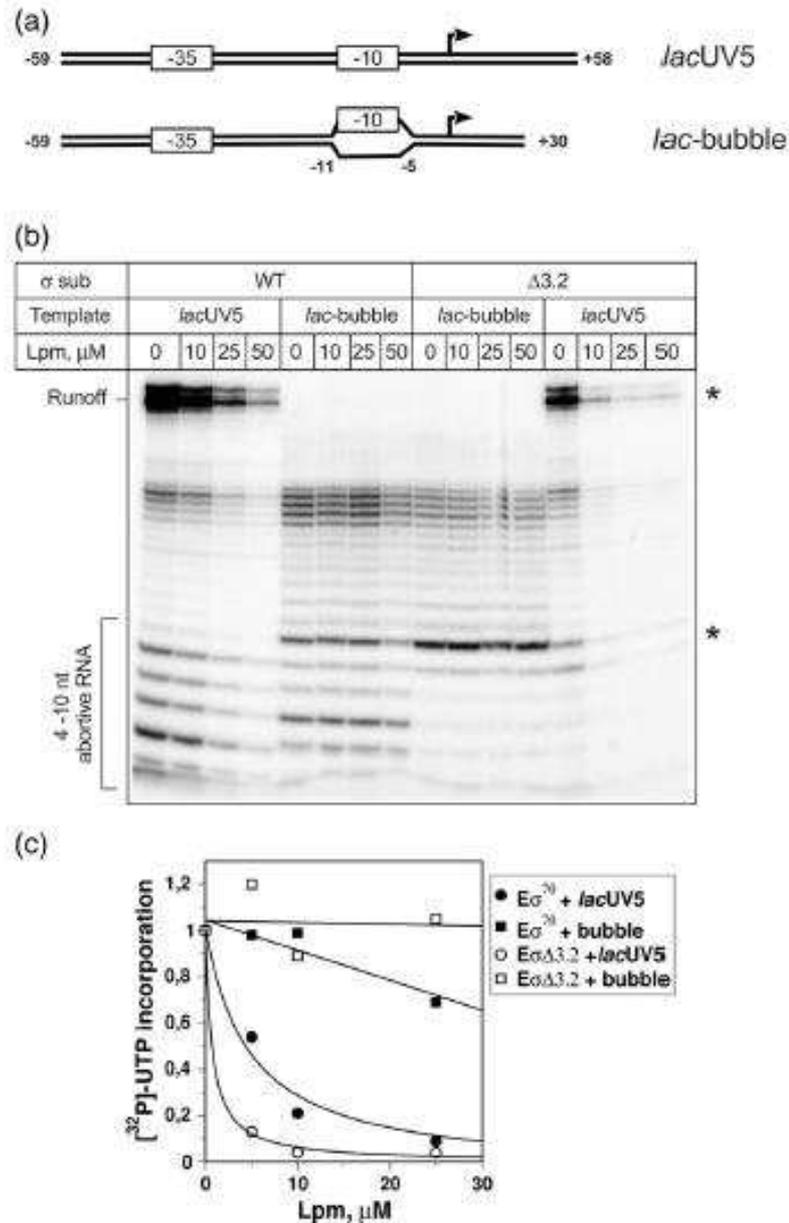
#### Mismatch bubble spanning the $-10$ element of the promoter DNA abolished Lpm action

To explore whether Lpm could inhibit transcription from the promoter DNA template, under condition wherein the  $\sigma$  function in the nucleation of promoter

melting was dispensable, we used a heteroduplex *lacUV5* promoter containing a mismatch-bubble (*lac-bubble*) spanning promoter positions  $-5$  to  $-11$  (Fig. 3a). Run-off transcription from the "*lac-bubble*" template by  $\sigma^{70}$ -RNAP and  $\sigma_{\Delta 3.2}$ -RNAP was performed at increasing concentrations of Lpm (Fig. 3b and c). The homoduplex DNA *lacUV5* promoter fragment was used in control reactions. Both the wild type and the mutant RNAPs displayed similar activities on the "*lac-bubble*" template, and their abortive RNAs patterns mirrored that obtained on the homoduplex *lacUV5* promoter with the characteristic lack of the 4- to 8-nt abortive RNA products in the case of  $\sigma_{\Delta 3.2}$ -RNAP. Transcription from the "*lac-bubble*" template was fully resistant to Lpm, and the  $\sigma$  region 3.2 deletion had no effect on the sensitivity of RNAP to the drug. Because, in our experiment, Lpm was added to RNAP before the addition of DNA, we concluded that either it should be displaced from the binding site upon template ssDNA binding or RNAP could accommodate both ssDNA and Lpm in the active-site cleft. In summary, the results obtained on the mismatch-bubble template suggested that, only when the  $\sigma$ -dependent promoter melting step is engaged, the sensitivity of RNAP to Lpm strongly depends on the structure of  $\sigma$  region 3.2.

#### Deletion in $\sigma^{70}$ region 3.2 and Lpm destabilized interactions between RNAP and the downstream duplex DNA of the promoter

Because Lpm targets isomerization from  $RP_o$  to  $RP_c$ , we proposed that changes in the  $\sigma$  subunits conferring hypersensitivity to Lpm might also impart defects to  $RP_o$  formation. To explore this hypothesis, we used DNase I footprinting to compare the structures of the *lacUV5* promoter open complexes, formed at  $37^\circ\text{C}$  by the RNAPs containing  $\sigma^S$  and  $\sigma_{\Delta 3.2}$  (Fig. 4a and Fig. S3). The experiment was performed in the absence or in the presence of  $50 \mu\text{M}$  Lpm. In  $RP_o$ , the  $\sigma^{70}$ -RNAP protected the template DNA strand, from position approximately  $-46$  to position  $+16$ , and induced the formation of two DNase I-hypersensitive sites (DHS) around positions  $-26$  and  $-37$  (Fig. 4a). The  $\sigma^S$ -RNAP produced altered protection at the  $-35$  element and lack of the upstream DHS. Furthermore, positions  $-18$  and  $-19$ , protected by  $\sigma$  domain 3, were more accessible to DNase I in  $\sigma^S$ - $RP_o$  than in  $\sigma^{70}$ - $RP_o$  (Fig. S3). These results were in agreement with the published Fe-BABE cleavage data showing that  $\sigma^S$  and  $\sigma^{70}$  domains 3 and 4 interacted differently with the *lacUV5* promoter DNA [27]. The  $\sigma_{\Delta 3.2}$ -RNAP produced an upstream protection pattern (positions  $-24$  to  $-46$ ) identical with that of the  $\sigma^{70}$ -RNAP, while the downstream DNA between positions  $-24$  and  $+16$  was less protected (Fig. S3). The most pronounced differences were observed at the downstream protection boundary (positions  $+14$

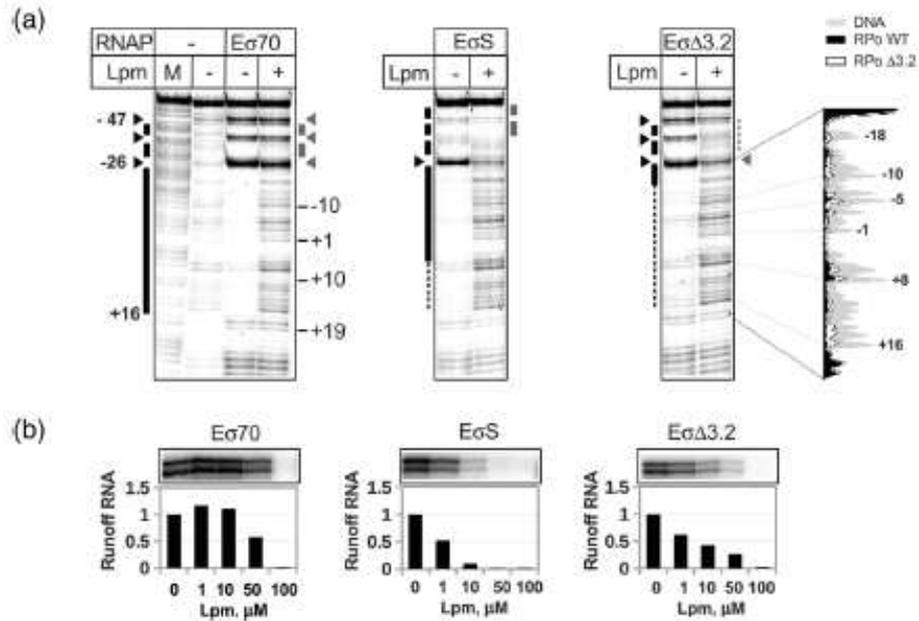


**Fig. 3.** Influence of the DNA template architecture on the sensitivity of RNAP to Lpm. (a) A scheme of the *lacUV5* promoter and the synthetic mismatch-bubble, "lac-bubble" template. The  $-10$  and  $-35$  elements of the *lacUV5* promoter are boxed. The transcription start site is indicated by arrow. Numbers indicate positions of the template ends relative to  $\pm$ s. (b) Run-off transcription from the *lacUV5* promoter and the lac-bubble templates. Transcription was performed in the presence of increasing concentrations of Lpm. (c) Quantification of the experiments shown in (b). Asterisks indicate bands that were used for quantification.

to  $+16$ ), which might reflect destabilization of the interactions between RNAP jaw/clamp domains and the downstream duplex DNA [28].

In the presence of Lpm, the  $\sigma^{70}$ -RNAP formed contacts with the promoter DNA upstream of position

$-25$  with the same efficiency as in the absence of the drug, while the protection of DNA between positions  $-25$  and  $+16$  was reduced, in agreement with previous reports [12]. This DNase I protection pattern, obtained in the presence of Lpm, might



**Fig. 4.** The Lpm-hypersensitive RNAPs form  $RP_o$  with altered structure. (a) DNase I footprinting of  $RP_o$  formed on the *lacUV5* promoter by  $\sigma^{70}$ -RNAP (E $\sigma^{70}$ ),  $\sigma^S$ -RNAP (E $\sigma^S$ ) and  $\sigma_{\Delta 3.2}$ -RNAP (E $\sigma_{\Delta 3.2}$ ) either without or in the presence of 50  $\mu$ M Lpm. DNA labeled at the 5'-end of template strand. M, "A + G" sequencing marker. Positions of the protected regions are indicated by black (without Lpm) or gray (with Lpm) lines on the left and on the right side of the gels correspondingly. Triangles show the DNase I-hypersensitive sites. Comparison of the DNase I protection profiles for free DNA,  $\sigma^{70}$ - $RP_o$  and  $\sigma_{\Delta 3.2}$ - $RP_o$  is shown on the right side of the (a). (b) Run-off [ $^{32}$ P]RNA products synthesized on *lacUV5* promoter by RNAPs under conditions identical with that in (a). Transcription was performed in the presence of increasing concentrations of Lpm. Values were normalized to the quantity of RNA synthesized without Lpm.

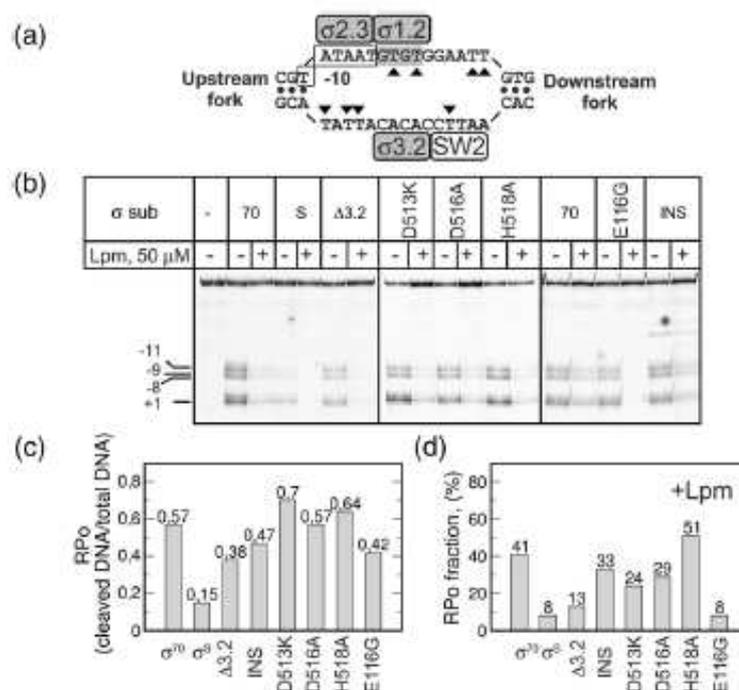
reflect the existence of a mixed population of promoter complexes:  $RP_c$ , with loose or absent downstream DNA contacts, and  $RP_o$ , with the DNase I protection extended to +16. The  $\sigma^S$ -RNAP and  $\sigma_{\Delta 3.2}$ -RNAP were unable to form stable promoter contacts downstream of position -26 in the presence of Lpm. Furthermore, in contrast with the RNAP containing wild-type  $\sigma^{70}$ , the interactions with the upstream part of the promoter were also strongly inhibited. Thus, almost no protection was observed with  $\sigma_{\Delta 3.2}$ -RNAP, while the presence of the weak DHS in position -26 indicated that promoter binding did occur. The  $\sigma^S$ -RNAP displayed an altered protection pattern between positions -26 and -50 with the appearance of protection upstream of position -39 and abolished protection at the -35 element.

To estimate the extent of inhibition by Lpm under the conditions used for DNase I footprinting experiments (200 nM core RNAP and 1  $\mu$ M  $\sigma$  subunit), we performed run-off transcription assay (Fig. 4b). In 50  $\mu$ M Lpm,  $\sigma^{70}$ -RNAP was inhibited to ~50%,  $\sigma_{\Delta 3.2}$ -RNAP was inhibited to ~75% and  $\sigma^S$ -RNAP was fully inhibited, in perfect correlation with the

extent of DNase I cleavage at promoter positions -25 to +16 observed in the presence of Lpm (Fig. 4a and Fig. S3). Based on these results, we concluded that, in the presence of Lpm, RNAP binds to promoter DNA only at the -35 element ( $\sigma$  region 4 contacts) and upstream ( $\alpha$  subunit CTD contacts), but it was unable to form stable contacts with the -10 element and further downstream.

#### $\sigma^{70}$ Regions 1.2 and 3.2 reduce the cold sensitivity of promoter melting

Next, we explored whether the mutations conferring Lpm sensitivity could affect promoter melting. The ability of RNAP containing  $\sigma$  subunit variants to open the *lacUV5* promoter DNA at 37  $^{\circ}$ C, a condition under which  $RP_o$  formation is favored, was tested by  $KMnO_4$  probing (Fig. 5 and Fig. S4). The template strand thymines ( $T_{+11}$ ,  $T_{-8}$ ,  $T_{-9}$  and  $T_{-11}$ ) and the non-template strand thymines ( $T_{-5}$ ,  $T_{-3}$ ,  $T_{+3}$  and  $T_{+4}$ ) become accessible to  $MnO_4^-$  during the formation of transcription bubble (Fig. 5a). The *lacUV5* promoter fragment used for the  $KMnO_4$  probing was double labeled at the non-template and



**Fig. 5.** Effect of variations in structure of the  $\sigma$  subunit on  $RP_o$  formation at 37 °C. (a) Scheme showing organization of the *lacUV5* promoter transcription bubble. The  $\sigma$  subunit regions (gray rectangles) and the  $\beta$ -SW2 (white rectangle) contacting ssDNA in  $RP_o$  are shown. The -10 element of promoter in  $RP_o$  are shown. The -10 element of promoter is boxed; the "discriminator" region is in gray. Thymines reactive to  $KMnO_4$  are indicated by black rectangles. (b)  $KMnO_4$  probing of  $RP_o$  formed on *lacUV5* promoter. DNA labeled at the 5'-end of template DNA strand. Positions of the thymines reactive to  $KMnO_4$  are indicated. (c and d) Quantification of the experiment shown in (b). The values represent DNA fraction bound in  $RP_o$  (c) and the residual  $RP_o$  fraction in the presence of 50  $\mu$ M Lpm (d).

the template DNA strands, which allowed us to follow three events in one experiment: (1) melting of the -10 promoter element by  $\sigma$  region 2 that is reflected by the modification of thymines  $T_{-9}$ ,  $T_{-9}$  and  $T_{-11}$ ; (2) unstacking of DNA bases at the discriminator element (DIS), reflected by the modification of thymines  $T_{-5}$  and  $T_{-3}$ ; and (3) the transcription start site (*tss*) opening, reflected by the modification of thymines,  $T_{+1}$ ,  $T_{+3}$  and  $T_{+4}$ . The fraction of *lacUV5* promoter DNA engaged in  $RP_o$  was calculated as the ratio of total cleaved DNA (the sum of signals corresponding to cleavages at each modified thymine site) to the total DNA added to the reaction. RNAPs containing  $\sigma$  subunits, with substitutions D513K, D516A and H518A, formed  $RP_o$  with the same efficiency as the wild-type RNAP. In the case of the  $\sigma_{D513K}$  mutant, a detectable increase in the transcription start site  $T_{+1}$  cleavage signal, relative to the upstream cleavage signals ( $T_{-9}$ ,  $T_{-9}$  and  $T_{-11}$ ), was observed. Therefore, even a single-residue substitution in  $\sigma$  region 3.2 could change the conformation of the template ssDNA strand (Fig. S4a). Only a slight decrease in

the  $RP_o$  fraction was observed in the case of RNAP containing  $\sigma_{E116G}$ ,  $\sigma_{\Delta 3.2}$  and  $\sigma_{INS}$ . The most dramatic promoter melting defect was observed with  $\sigma^S$ -RNAP, which formed four-fold less  $RP_o$  than  $\sigma^{70}$ -RNAP (Fig. 5c). This difference might be accounted for the decreased promoter occupancy caused by the low affinity of  $\sigma^S$  for core RNAP [29]. However, the results of DNase I footprinting experiments (Fig. 4a), showing that the promoter occupancies for both RNAPs were similar, argued against that assumption and indicated that  $\sigma^S$  might be deficient in promoter melting. The  $KMnO_4$  probing experiments, performed in the presence of 50  $\mu$ M Lpm, showed that promoter melting by the RNAPs containing  $\sigma^{70}$  and  $\sigma_{H518A}$  was inhibited to ~50% (Fig. 5c). This result confirmed our conclusions drawn from the DNase I footprinting experiments, that the partial downstream protection observed with  $\sigma^{70}$ -RNAP in the presence of Lpm reflected the presence of a mix of  $RP_c$  and  $RP_o$ . The RNAPs containing  $\sigma_{D513K}$ ,  $\sigma_{D516A}$  and  $\sigma_{INS}$  were more sensitive to Lpm, and the strongest inhibition was

observed for RNAPs containing  $\sigma^S$ ,  $\sigma_{\Delta 3.2}$  and  $\sigma_{E116G}$  (Fig. 5c) in perfect accordance with the  $IC_{50}$  values obtained in the transcription assay (Fig. 2f).

To test the ability of  $\sigma$  subunit variants to drive  $RP_o$  formation under conditions in which DNA melting becomes limited by the temperature-dependent conformational change in RNAP [30,31], complexes of RNAP and *lacUV5* promoter were formed at different temperatures (15, 20, 25, 30 and 37 °C) and were probed by  $KMnO_4$  (Fig. 6, Fig. S4b and c and Fig. S5). The efficiency of DNA opening at each thymine position was quantified as described above. In the case of the  $\sigma^{70}$ -RNAP, an uncoupling in the DNA opening at the -10 element and downstream, at the *tss*, was observed. The transition temperature

( $T_m$ ) for opening of the -10 element DNA was calculated to be -20 °C, while opening of *tss* required a -5 °C higher temperature. Less difference in  $T_m$  was observed between the discriminator and *tss* at the non-template strand (Fig. S4c). Deletion in  $\sigma$  region 3.2 increased the  $T_m$  of the -10 element and *tss* and eliminated the difference in  $T_m$  between the upstream and downstream parts of the transcription bubble (Fig. 6b and Fig. S4). The  $\sigma$  subunits containing single amino acid substitutions, D513K and H518A, showed no cold-sensitive defects in promoter melting and display overall temperature dependence similar to that of the wild-type  $\sigma^{70}$  (Fig. 6 and Fig. S5a). Noticeably, the D513K substitution decreased the  $T_m$  of DNA at *tss* but did not affect the

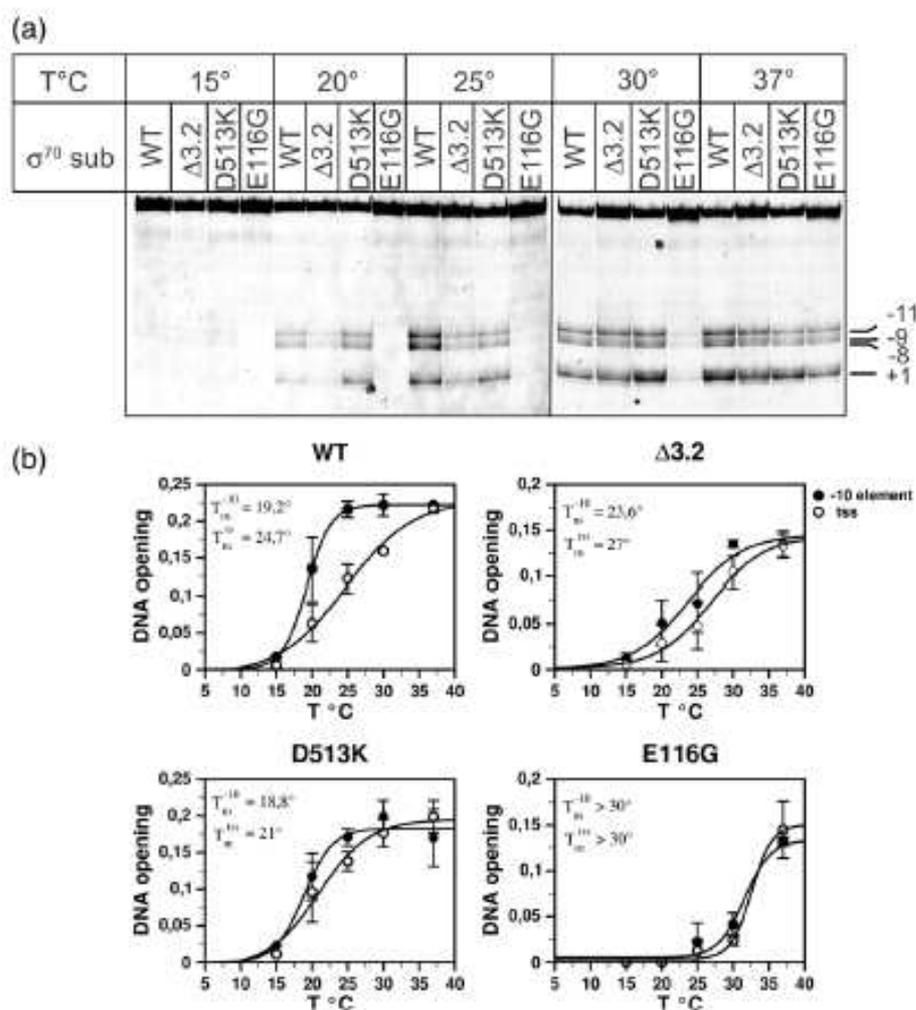


Fig. 6. Temperature dependence of the *lacUV5* promoter melting by RNAP containing mutant  $\sigma$  subunits. (a)  $KMnO_4$  probing of the  $RP_o$  complexes formed at the indicated temperatures. DNA labeled at the 5'-end of template strand. (b) Quantification of the data in (a) processed the same way as in Fig. 5c. Mean values and standard deviations of two independent experiments are shown.

$T_m$  of the  $-10$  element [8]. Taken together, these data demonstrated that  $\sigma$  region 3.2 was implicated in stabilization of the transcription bubble in  $RP_o$ . Interestingly, the  $\sigma_{E116G}$  displayed even stronger temperature dependence on promoter melting with a  $T_m$  higher than  $30^\circ\text{C}$ , suggesting that region 1.2 plays a critical role in isomerization from  $RP_c$  to  $RP_o$ , likely by stabilizing the contacts between the  $\sigma_2$  domain and the  $-10$  element. The temperature dependence of the transcription bubble formation by  $\sigma^S$ -RNAP was similar to that of the mutant RNAPs containing  $\sigma_{E116G}$  and  $\sigma_{\Delta 3.2}$  and indicated that structure of the regions 1.2 and 3.2 might be responsible for the increased cold sensitivity of  $\sigma^S$ -RNAP (Fig. S5c and d). Finally, the abovementioned results suggested that the  $\sigma$  region 3.2 deletion and the region 1.2 substitution E116G can affect Lpm action by compromising  $RP_o$  formation. In addition, the  $\sigma$  region 3.2 insertion, as well as the single amino acid substitutions D513K and D516A, which displayed no defects in melting but displayed slightly increased sensitivity to Lpm, likely imparted their effects by directly influencing Lpm binding.

## Discussion

In the present study, we demonstrated that the structure of  $\sigma$  subunit regions 1.2 and 3.2 had strong impacts on the proficiency of RNAP in promoter melting and its sensitivity to the antibiotic Lpm. Both of these regions of  $\sigma$  are implicated in the stabilization of transcription bubble via the interactions with template ( $\sigma$  region 3.2) and non-template ( $\sigma$  region 1.2) ssDNA strands. Because the  $\sigma$  subunit is not essential for the binding of Lpm to RNAP [12], we propose that regions 1.2 and 3.2 attenuate Lpm activity by promoting DNA strand separation during  $RP_o$  formation.

### Role of the $\sigma^{70}$ region 1.2 residue E116 in promoter melting

$\sigma^{70}$  Region 1.2 has been shown to play a role in  $RP_o$  formation [21,26]. In particular, residues 94–101 of the  $\sigma^{70}$  region 1.2 allosterically controlled recognition of the  $-10$  promoter element by the  $\sigma^{70}$  region 2.3 [8]. Additionally, interaction of residues 99–107 with the non-template DNA strand of the promoter “discriminator” region stabilizes RNAP-promoter complexes [7,32]. Our study supported the critical role of  $\sigma$  region 1.2 in promoter melting and suggested that it can contribute to recognition of the  $-10$  element independently of its ability to bind “discriminator” DNA. According to the structure of RNAP, the invariant residue E116 faced/contacted conservative residue K426 in  $\sigma$  region 2.3 and formed water-mediated contacts with the thymine at position  $-7$  of the  $-10$  element [3,5]. Thus, we

propose that interaction of residue E116 with  $\sigma^{70}$  domain 2 and  $-10$  element ssDNA can stabilize the contacts of  $\sigma$  region 2.3 with the bases  $T_{-7}$  and  $T_{-11}$  of the  $-10$  element required for the nucleation of DNA melting.

### Role of the $\sigma$ region 3.2 in promoter melting and promoter selectivity

The  $\sigma^{70}$  region 3.2 hairpin loop was suggested to be required for NTP binding and the first bond formation during *de novo* initiation of RNA synthesis [22,23], yet its implications in  $RP_o$  formation have not been reported before. The data presented here showed that deletion of  $\sigma_{3.2}$ -HL compromised the promoter melting capacity of RNAP and the downstream promoter DNA interactions in  $RP_c$ . Therefore, the defect in the *de novo* initiation conferred by the  $\sigma_{3.2}$ -HL deletion could arise in part from the defects in  $RP_o$  formation. This conclusion is supported by the fact that  $\sigma_{3.2}$ -HL, required for *de novo* initiation on the T7A1 promoter, was dispensable on the *lacUV5* promoter that has different sequence and spacing. Similarly, substitutions P504L and S506F in the N-terminal part of  $\sigma$  region 3.2 produced the promoter-sequence-dependent defects in transcription [33]. Positioning of  $\sigma_{3.2}$ -HL on the structural models of the open complex suggests that  $\sigma_{3.2}$ -HL, together with the  $\beta'$ -SW2 region, controls the entry and stabilization of template strand ssDNA inside the RNAP active-site cleft [5,34,35]. Consequently, in the absence of  $\sigma_{3.2}$ -HL, the template strand ssDNA would be loosely bound to RNAP and promoter melting would be compromised. We found that, similar to the mutant  $\sigma_{\Delta 3.2}^{70}$ -RNAP,  $\sigma^S$ -RNAP (bearing intact  $\sigma_{3.2}$ -HL) displayed increased cold sensitivity of the *lacUV5* promoter opening, hypersensitivity to Lpm and synthesized reduced amounts of abortive RNA products. These properties of  $\sigma^S$ -RNAP may be determined at least in part by the amino acid sequences in the  $\sigma^S$  region 3.2 that is different from that of  $\sigma^{70}$ . We propose that  $\sigma$  region 3.2 of  $\sigma^{70}$  is optimized for efficient transcription initiation across a wide range of promoters, while deviations from the  $\sigma^{70}$  region 3.2 sequence in alternative  $\sigma$  subunits might narrow the spectrum of genes transcribed by RNAP. Thus, the  $\sigma^{H}$ -type insertion in the region 3.2 of  $\sigma^{70}$  abolished *de novo* initiation on the T7A1 promoter, while transcription from the *lacUV5* promoter was less affected. Taken together, current data suggest that it is not the physical presence of  $\sigma_{3.2}$ -HL in the RNAP active-site cleft but its structural organization is critical for the  $\sigma$  subunit activity. However, we cannot exclude that some specific contacts formed by the  $\sigma$  region 3.2 residues, which were not probed by mutagenesis in our study, contribute to high proficiency of  $\sigma^{70}$  in transcription initiation.

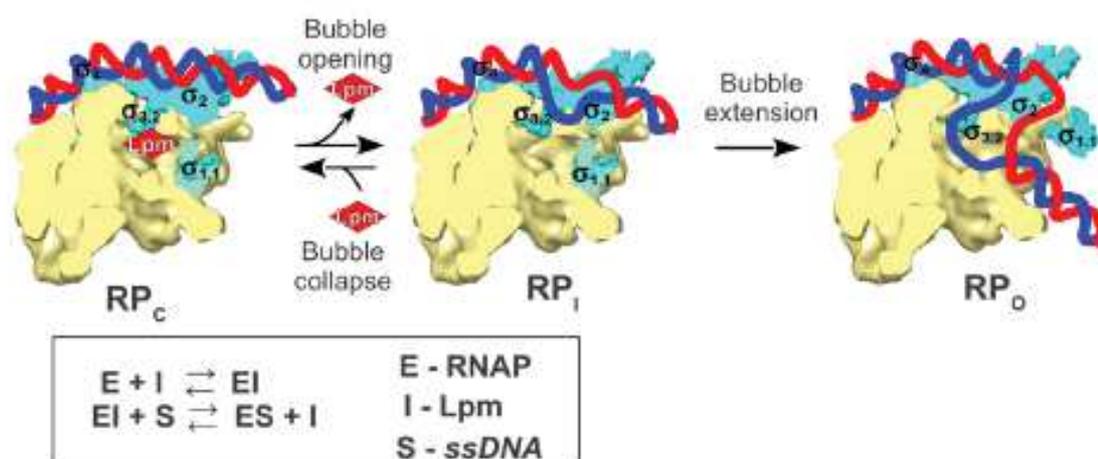
$\sigma$  Region 3.2 and Lpm mechanism

The current study allowed us to revise the previously proposed model of Lpm action, according to which the antibiotic prevent stable binding of the template ssDNA into the RNAP active-site cleft and the subsequent stable binding of the downstream DNA duplex (dwDNA) into the jaw/clamp channel of RNAP [12,14]. In particular, it has been suggested that dwDNA binds the RNAP jaw/clamp channel in the presence of Lpm, when promoter melting was fully abolished. Now, using Lpm-hypersensitive RNAPs, we showed that dwDNA-RNAP contacts could not be formed in the presence of the drug, and this finding coincided with the lack of DNA opening. In the presence of Lpm, RNAP bound to the promoter only at the  $-35$  element ( $\sigma$  region 4.2 contacts) and upstream ( $\alpha$  subunit CTD contacts), thus forming complexes that resembled the short-lived closed intermediates observed in real-time footprinting experiments (complex B or C in Rogozina *et al.* [31]). Our results supported the inhibition mechanism where Lpm targets  $\sigma$ -dependent nucleation of bubble opening at the  $-10$  element and suggested that binding of the template ssDNA to RNAP plays an important role in this process (model in Fig. 7).

Tupin *et al.* previously have suggested that deletion of residues 513–519 in the  $\sigma^{70}$  region 3.2 confers to RNAP resistance to Lpm [12]. Here we demonstrated that this deletion produced an opposite effect and converts RNAP into Lpm-hypersensitive enzyme. This discrepancy may be accounted for by the N-terminal mutations (I48V and E116G) in  $\sigma^{70}$  used as a “wild-type” control by Tupin *et al.* and by the fact that  $\sigma^{70}$ , used in their study, was refolded

from inclusion bodies. The published data on Lpm titration, performed on promoter-less DNA scaffold template, have demonstrated that  $\sigma^{70}$  has only marginal effects on the affinity of Lpm to RNAP [12]. Our current work showed that, only when a  $\sigma$ -dependent promoter melting event is implicated, structure of  $\sigma$  region 3.2 strongly affects Lpm activity. Based on these facts, we propose that  $\sigma$  region 3.2 may influence Lpm action in two ways: (1) owing to its role in  $RP_o$  formation, by stabilizing template ssDNA at the active site and (2) by interfering with Lpm binding.

RNAP was not inhibited by Lpm on the mismatch-bubble template (under condition when the DNA opening step was bypassed) or if Lpm was added to preformed  $RP_o$  [12,13,36]. Based on the above-mentioned facts, we speculate that, upon  $RP_o$  formation, Lpm enters into competition with ssDNA and should be displaced out of the RNAP active-site cleft to allow for ssDNA binding (Fig. 7). This process might occur either by direct completion or by ssDNA binding perhaps inducing conformational changes in RNAP and consequently favoring Lpm dissociation. When local concentration of ssDNA at the active site is not limited by the promoter melting step (the case of the mismatch-bubble template), ssDNA wins in competition with Lpm. In the opposite case, when the availability of ssDNA for binding to RNAP depends on the capacity of RNAP to nucleate melting and to hold DNA strands separately (the case of promoter homoduplex DNA template), Lpm wins the competition. This “competition” model is supported by stabilization of the template ssDNA in the active site by the 7-mer RNA primer suppressing inhibition [12]. Alternative mechanism would imply that RNAP active-site cleft can accommodate both:



**Fig. 7.** Model describing hypothetical mechanism of inhibition by Lpm. Mechanism is formalized by the simplified equilibrium binding equation presented beneath the model. Core RNAP is depicted as a clipped surface model in khaki.  $\sigma$  subunit shown in cyan. Promoter DNA template strand, blue; non-template strand, red. Position of the  $\sigma$  subunit domains  $\sigma_{1.1}$ ,  $\sigma_2$ ,  $\sigma_{3.2}$  and  $\sigma_4$  is indicated. Lpm is presented as a red rhombus.

Lpm and ssDNA. We favor the competition mechanism because, considering the size of the Lpm molecule (molecular mass: 1058 Da, volume: 994 Å<sup>3</sup>), there is little space remaining in the RP<sub>o</sub> structure for binding two ligands.

Lastly, our study demonstrated that natural antimicrobials could act as  $\sigma$ -specific transcriptional repressors, acting in a DNA-template-dependent manner. Antibiotics such as Lpm could be used as scaffolds for the development of RNAP-targeting molecules able to silence the regulons controlled by the alternative  $\sigma$  subunits implicated in pathogenesis and virulence. Such molecules could have a broad range of applications in medicine, biotechnology and basic science. The roles of Lpm and other "switch-targeting" antibiotics in the regulation of bacterial gene expression remain a challenging subject for future studies.

## Materials and Methods

### Antibiotics, proteins and DNA templates

Lipiarmycin (trade name fidaxomicin), isolated from *Dactylosporium aurantiacum*, was purchased from Santa Cruz. The stock solution of Lpm was prepared in 100% methanol and stored at -20 °C. Working solutions were prepared in each experiment by diluting stock to desired concentration in 50% methanol. Recombinant *E. coli* core RNAP was expressed in *E. coli* BL21(DE3) cells from pVS10 plasmid [37] and purified by HisTrapFF and HiTrap Heparin HP (GE) affinity chromatography, according to the manufacturer's protocol, followed by MonoQ (GE) chromatography as previously described [38]. The *rhoD* and *rhoS* genes were PCR amplified by the gene-specific primers from genomic DNA of *E. coli* K-12 MG1655 strain and cloned into the pET28a vector under the N-terminal 6xHis tag (Table S2). The mutant *rhoD* derivatives were constructed by site-directed mutagenesis using QuikChange Lightning site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies). The wild-type and mutant  $\sigma$  subunits were expressed in *E. coli* BL21(DE3) strain and purified from cell lysates using chromatography on HiTrap™ TALON® and Superose 6, 10/300 GL columns (GE Healthcare). The 116-bp *lacUV5* promoter fragment (promoter positions from -59 to +58) was produced by PCR amplification using the fluorescent labeled primers (Table S2). The *lacUV5* mismatch-bubble template was assembled by annealing of the fluorescent dye-labeled oligonucleotides (Table S2) in the transcription buffer (TB) containing 40 mM Hepes (pH 8.0), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 5% glycerol.

### In vitro transcription and determination of IC<sub>50</sub>

Transcription was performed in 10  $\mu$ l TB. The RNAP holoenzyme was assembled by mixing 100 nM core RNAP and 200 nM  $\sigma$  subunit and then incubating them for 5 min at 37 °C. Next, one-tenth reaction volume of Lpm solution in 50% methanol was added and incubated with

RNAP at 37 °C for 10 min. Because methanol, in which was dissolved Lpm, inhibits RNAP, an equal volume of methanol (5% v/v final concentration) was added to the control reactions performed without Lpm. The mixture was then incubated with a *lacUV5* promoter or *lacUV5* mismatch-bubble template (40 nM) at 37 °C for 10 min. Transcription was initiated by addition of ATP, GTP, CTP (25  $\mu$ M each final concentration), 3  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP, 1  $\mu$ M cold UTP and heparin (0.05 mg/ml final), and it was carried out for 5 min at 37 °C. Reactions were stopped by adding 1 volume of the stop solution (8 M urea and 20 mM ethylenediaminetetraacetic acid). [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]RNA products were resolved on a 24% PAGE/7 M urea denaturing gel. Gels were scanned with Typhoon 9400 Imager (GE Healthcare) and quantified using ImageQuant software.

### KMnO<sub>4</sub> probing and DNase I footprinting

KMnO<sub>4</sub> probing and DNase I footprinting reactions were performed in 20  $\mu$ l TB. The RNAP holoenzymes were prepared by incubating core RNAP (200 nM) with either wild type or mutant  $\sigma$ <sup>70</sup> subunits (1  $\mu$ M) in TB for 5 min at 37 °C. Then samples were supplemented with either 2  $\mu$ l of Lpm (50  $\mu$ M final concentration) or 50% methanol and incubated for 10 min at 37 °C. The *lacUV5* promoter fragment (40 nM) was added to the reactions and incubated for another 10 min at 37 °C. The samples were treated with 5 mM KMnO<sub>4</sub> for 30 s and processed as described before [12]. DNase I footprinting was performed at 37 °C with 0.5 U/ml of DNase I (Promega) for free DNA and 1 U/ml of DNase I for RNAP-promoter complexes. DNA fragments were analyzed on 10% PAGE/urea sequencing gel.

## Acknowledgements

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2015.12.017>.

Received 6 August 2015;

Received in revised form 22 December 2015;

Accepted 22 December 2015

Available online 24 December 2015

### Keywords:

fidaxomicin;  
rhoS;  
promoter melting;  
switch region;  
TRIIB B-reader

**Abbreviations used:**

RNAP, RNA polymerase; ssDNA, single-stranded DNA; dwDNA, downstream DNA duplex; TB, transcription buffer.

**References**

- [1] T.M. Gruber, C.A. Gross, Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space, *Annu. Rev. Microbiol.* 57 (2003) 441–466.
- [2] R.M. Saecher, M.T.J. Record, P.L. Dehaseth, Mechanism of bacterial transcription initiation: RNA polymerase-promoter binding, isomerization to initiation-competent open complexes, and initiation of RNA synthesis, *J. Mol. Biol.* 412 (2011) 754–771.
- [3] A. Feklistov, S.A. Darst, Structural basis for promoter –10 element recognition by the bacterial RNA polymerase  $\sigma$  subunit, *Cell* 147 (2011) 1257–1269.
- [4] Y. Zuo, T.A. Steitz, Crystal structures of the *E. coli* transcription initiation complexes with a complete bubble, *Mol. Cell* 58 (2015) 534–540.
- [5] Y. Zhang, Y. Feng, S. Chatterjee, S. Tuske, M.X. Ho, E. Arnold, R.H. Ebright, Structural basis of transcription initiation, *Science* 338 (2012) 1076–1080.
- [6] D.G. Vassilyev, M.N. Vassilyeva, A. Perederina, T.H. Tahirov, I. Artsimovitch, Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase, *Nature* 448 (2007) 157–162.
- [7] S.P. Haugen, M.B. Berkmen, W. Ross, T. Gaal, C. Ward, R.L. Gourse, rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: An additional recognition element for RNA polymerase, *Cell* 125 (2006) 1069–1082.
- [8] N. Zenkin, A. Kulbachinsky, Y. Yuzenkova, A. Mustaev, I. Bass, K. Severinov, K. Brodolin, Region 1.2 of the RNA polymerase sigma subunit controls recognition of the –10 promoter element, *EMBO J.* 26 (2007) 955–964.
- [9] D. Kostrewa, M.E. Zeller, K. Armache, M. Seizl, K. Leike, M. Thomm, P. Cramer, RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation, *Nature* 462 (2009) 323–330.
- [10] X. Liu, D.A. Bushnell, D. Wang, G. Calero, R.D. Komberg, Structure of an RNA polymerase II-TFIIB complex and the transcription initiation mechanism, *Science* 327 (2010) 206–209.
- [11] D. Pupov, N. Miropolskaya, A. Sevostyanova, I. Bass, I. Artsimovitch, A. Kulbachinsky, Multiple roles of the RNA polymerase  $\beta'$  SW2 region in transcription initiation, promoter escape, and RNA elongation, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 5784–5796.
- [12] A. Tupin, M. Guaiteri, J. Leonetti, K. Brodolin, The transcription inhibitor lipiamycin blocks DNA fitting into the RNA polymerase catalytic site, *EMBO J.* 29 (2010) 2527–2537.
- [13] I. Artsimovitch, J. Seddon, P. Sears, Fidaxomicin is an inhibitor of the initiation of bacterial RNA synthesis, *Clin. Infect. Dis.* 55 (2012) S127–S131.
- [14] K. Brodolin, Antibiotics trapping transcription initiation intermediates: To melt or to bend, what's first? *Transcription* 2 (2011) 60–65.
- [15] A. Srivastava, M. Talaue, S. Liu, D. Degen, R.Y. Ebright, E. Sineva, A. Chakraborty, S.Y. Druzhinin, S. Chatterjee, J. Mukhopadhyay, Y.W. Ebright, A. Zozula, J. Shen, S. Sengupta, R.R. Niedfeldt, C. Xin, T. Kaneko, H. Irshchik, R. Jansen, S. Donadio, N. Connell, R.H. Ebright, New target for inhibition of bacterial RNA polymerase: "Switch region", *Curr. Opin. Microbiol.* 14 (2011) 532–543.
- [16] G.A. Belogurov, M.N. Vassilyeva, A. Sevostyanova, J.R. Appleman, A.X. Xiang, R. Lira, S.E. Webber, S. Kyuyev, E. Nudler, I. Artsimovitch, D.G. Vassilyev, Transcription inactivation through local refolding of the RNA polymerase structure, *Nature* 457 (2009) 332–335.
- [17] A. Chakraborty, D. Wang, Y.W. Ebright, Y. Kortam, E. Kortkhorjia, T. Kim, S. Chowdhury, S. Wigneshwerraj, H. Irshchik, R. Jansen, B.T. Nixon, J. Knight, S. Weiss, R.H. Ebright, Opening and closing of the bacterial RNA polymerase clamp, *Science* 337 (2012) 591–596.
- [18] A. Typas, G. Becker, R. Hengge, The molecular basis of selective promoter activation by the sigmaS subunit of RNA polymerase, *Mol. Microbiol.* 63 (2007) 1296–1306.
- [19] R.S. Basu, B.A. Warner, V. Molodtsov, D. Pupov, D. Esyunina, C. Fernández-Tornero, A. Kulbachinsky, K.S. Murakami, Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 24549–24559.
- [20] K.S. Murakami, X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma^{70}$  holoenzyme, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 9126–9134.
- [21] N.E. Baldwin, A.J. Dombroski, Isolation and characterization of mutations in region 1.2 of *Escherichia coli* sigma70, *Mol. Microbiol.* 42 (2001) 427–437.
- [22] A. Kulbachinsky, A. Mustaev, 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 (2006) 18273–18276.
- [23] D. Pupov, I. Kuzin, I. Bass, A. Kulbachinsky, Distinct functions of the RNA polymerase  $\sigma$  subunit region 3.2 in RNA priming and promoter escape, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 4494–4504.
- [24] K.S. Murakami, S. Masuda, S.A. Darst, Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution, *Science* 296 (2002) 1280–1284.
- [25] M. Guaiteri, A. Tupin, K. Brodolin, J. Leonetti, Frequency and characterization of spontaneous lipiamycin-resistant *Enterococcus faecalis* mutants selected *in vitro*, *Int. J. Antimicrob. Agents* 34 (2009) 605–606.
- [26] C. Wilson, A.J. Dombroski, Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase, *J. Mol. Biol.* 267 (1997) 60–74.
- [27] F. Collard, N. Fujita, D. Kotlarz, J.A. Bown, C.F. Meares, A. Ishihama, A. Kolb, Positioning of sigma(S), the stationary phase sigma factor, in *Escherichia coli* RNA polymerase-promoter open complexes, *EMBO J.* 18 (1999) 4049–4059.
- [28] A. Drennan, M. Kraemer, M. Capp, T. Gries, E. Ruff, C. Sheppard, S. Wigneshwerraj, I. Artsimovitch, M.T.J. Record, Key roles of the downstream mobile jaw of *Escherichia coli* RNA polymerase in transcription initiation, *Biochemistry* 51 (2012) 9447–9459.
- [29] S. Kusano, Q. Ding, N. Fujita, A. Ishihama, Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 70 and E sigma 38 holoenzymes. Effect of DNA supercoiling, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 1998–2004.
- [30] H. Buc, W.R. McClure, 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 (1985) 2712–2723.
- [31] A. Rogozha, E. Zaychikov, M. Buckle, H. Heumann, B. Solav, DNA melting by RNA polymerase at the T7A1

- promoter precedes the rate-limiting step at 37 °C and results in the accumulation of an off-pathway intermediate, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 5390–5404.
- [32] S.P. Haugen, W. Ross, M. Manrique, R.L. Gourse, Fine structure of the promoter-sigma region 1.2 interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 3292–3297.
- [33] M. Cashel, L.M. Hsu, V.J. Hernandez, Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* sigma 70 reduce abortive transcription and enhance promoter escape, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 5539–5547.
- [34] K.S. Murakami, S. Masuda, E.A. Campbell, O. Muzzin, S.A. Dast, Structural basis of transcription initiation: An RNA polymerase holoenzyme-DNA complex, *Science* 296 (2002) 1285–1290.
- [35] I. Touloukhanov, R. Landick, The role of the lid element in transcription by *E. coli* RNA polymerase, *J. Mol. Biol.* 361 (2006) 644–658.
- [36] S. Sergio, G. Pisci, R. White, F. Parenti, Lipiamycin, a new antibiotic from *Actinoplanes*. III. Mechanism of action, *J. Antibiot.* 28 (1975) 543–549.
- [37] G.A. Beloguzov, M.N. Vassilyeva, V. Svetlov, S. Klyuyev, N.V. Grishin, D.G. Vassilyev, I. Artsimovitch, Structural basis for converting a general transcription factor into an operon-specific virulence regulator, *Mol. Cell* 26 (2007) 117–129.
- [38] S. Bonkhov, A. Goldfab, Recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase: Purification of individually overexpressed subunits and *in vitro* assembly, *Protein Expr. Purif.* 4 (1993) 503–511.

# **CHAPITRE III : DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## A. Discussion

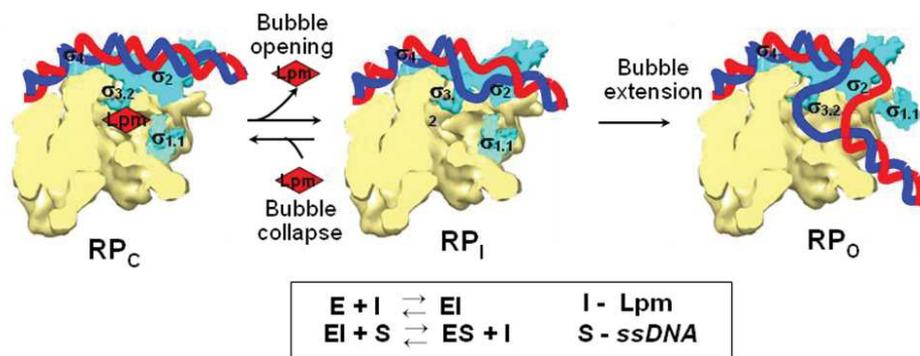
L'ARNP polymérase bactérienne est une enzyme centrale de l'expression génique et une cible pour les antibiotiques utilisés en première ligne pour le traitement de diverses maladies infectieuses. La sous-unité sigma de l'ARNP polymérase bactérienne participe à la reconnaissance du promoteur et à l'initiation de la transcription. Elle induit l'expression des gènes de virulence et est impliquée dans la génération d'infections persistantes qui résistent aux traitements des antibiotiques.

Dans ce projet, nous avons démontré que la structure des régions 1.2 et 3.2 de la sous-unité sigma avait des effets importants sur l'activité de l'ARNP dans la fusion du promoteur et sa sensibilité à la Lipiarmycine. Ces deux régions de sigma sont impliquées dans la stabilisation de la bulle de transcription via les interactions du brin non-matrice de l'ADN avec la région 1.2 et du brin matrice avec la région 3.2. La sous-unité sigma n'étant pas l'élément essentiel de la liaison de la Lpm à l'ARNP, nous proposons que les régions 1.2 et 3.2 atténuent l'activité de la Lpm en favorisant la séparation des brins d'ADN au cours de la formation du complexe RPo.

La région 1.2 joue un rôle dans la formation du complexe ouvert (RPo) (Baldwin and Dombroski, 2001; Wilson and Dombroski, 1997). En particulier, les résidus 94-101 de la région 1.2 du  $\sigma^{70}$  contrôlent allostériquement la reconnaissance de l'élément -10 du promoteur par la région 2.3 (Zenkin et al., 2007). De plus, l'interaction des résidus 99-107 avec l'élément discriminateur stabilise le complexe formé par l'ARNP et le promoteur (Haugen et al., 2006). Notre travail a mis en évidence le rôle critique de la région 1.2 dans la fusion du promoteur et nous avons suggéré qu'elle peut contribuer à la reconnaissance de l'élément -10 indépendamment de sa capacité à se lier à l'élément discriminateur. Selon la structure de l'ARNP, la région 1.2 se situe loin du site de fixation de la Lpm et son effet sur la sensibilité de l'ARNP à la Lpm est allostérique. En effet le résidu E116 interagit avec le résidu conservé K426 de la région 2.3 et forme un contact avec la thymine en position -7 de l'élément-10 (Feklistov and Darst, 2011; Zhang et al., 2012), Ainsi, nous proposons que l'interaction du résidu E116 avec le domaine  $\sigma_2$  peut stabiliser les contacts de la région 2.3 avec les bases T-7 et T-11 de l'élément -10 qui sont nécessaires à la nucléation de l'ADN au cours de l'ouverture du promoteur.

La région 3.2 joue également un rôle dans la sélection et la fusion du promoteur. Elle a été suggérée nécessaire à la première liaison de iNTP au cours de l'initiation de la synthèse de l'ARN (Kulbachinskiy and Mustaev, 2006; Pupov et al., 2014), bien que son implication dans

la formation du complexe ouvert n'ait pas été décrite auparavant. Nos données ont montré que la délétion de la boucle de la région 3.2 a compromis la fusion du promoteur ainsi que les interactions de l'ARNP avec l'ADN aval dans le complexe ouvert. En conséquence, le défaut d'initiation résultant de cette délétion pourrait provenir en partie du défaut dans la formation du complexe ouvert. Cette conclusion est appuyée par la nécessité de la présence de la boucle de la région 3.2 pour initier la transcription sur le promoteur T7A1. Cette présence n'est pas indispensable au promoteur *lacUV5*. De même, les substitutions P504L et S506F dans la partie N-terminale de la région 3.2 ont produit des défauts de transcription dépendants de la séquence du promoteur (Cashel et al., 2003). Le positionnement relatif de la boucle de  $\sigma_{3.2}$  dans le modèle structural du complexe ouvert pourrait indiquer que la boucle avec l'élément  $\beta'$  switch 2 contrôlerait l'entrée et la stabilisation du brin matrice à l'intérieur du site actif de l'ARNP (Touloukhonov and Landick, 2006; Zhang et al., 2012; Zuo and Steitz, 2015) (**Figure 44**).



**Figure 44.** Modèle du mécanisme d'action de la lipiarmycine.  $\sigma_{1.1}$ ,  $\sigma_2$ ,  $\sigma_{3.2}$  et  $\sigma_4$  (bleu clair), brin matrice (bleu) et brin non matrice (rouge).

Par conséquent, en l'absence de la boucle, le brin matrice serait faiblement lié à l'ARNP et la fusion de promoteur serait compromise. Nous avons constaté la même chose pour les mutants  $E\sigma_{\Delta 3.2}$  et  $E\sigma^S$  qui montrent une augmentation de la sensibilité au froid lors de l'ouverture du promoteur *lacUV5* et une hypersensibilité à Lpm avec une réduction de la synthèse des produits abortifs. Ces propriétés d' $E\sigma^S$  peuvent être déterminées au moins en partie par la séquence de la région 3.2 qui diffère de celle du facteur  $\sigma^{70}$ .

L'efficacité de la nucléation dans la fusion du promoteur dépend de la capacité de la région 2.3 à reconnaître les bases T-7 et T-11 de l'élément -10 (Feklistov and Darst, 2011). Ainsi, les substitutions spécifiques dans la région 2.3 ont induit une stringence dans la sélection du

promoteur par les groupes sigmas alternatifs 3 et 4 (Koo et al., 2009). La sensibilité au froid de la fusion du promoteur conférée par  $\sigma_{\Delta 3.2}$  ressemble à celle obtenue par les mutations de la région 2.3 (Juang and Helmann, 1994; Panaghie et al., 2000).

Nous proposons que la région 3.2 soit optimisée pour la formation de RPo parmi un grand nombre de promoteurs, tandis que les différences de séquence de la région 3.2 des sigmas alternatifs pourraient réduire l'éventail des gènes transcrits par l'ARNP. Ainsi,  $E\sigma^{70}$  et  $E\sigma^S$  montrent des sélectivités de promoteurs différentes, tandis que les deux sigmas peuvent reconnaître la plupart des promoteurs -10 et -35 (Lee and Gralla, 2002, 2001).

Ainsi,  $E\sigma_{INS}$  n'est pas active sur le promoteur T7A1, mais elle a une activité réduite sur le promoteur *lacUV5*. Cela indiquerait que ce n'est pas la présence physique de la boucle dans le site de l'ARNP, mais l'organisation de sa structure qui joue un rôle critique dans la fonction du facteur sigma. Nous ne pouvons pas exclure que les contacts spécifiques de quelques résidus de la région 3.2 qui n'ont pas été explorés par mutagenèse lors de notre étude, puissent contribuer à la forte efficacité de l'initiation de la transcription du facteur  $\sigma^{70}$ .

Les simulations de dynamique moléculaire ont montré que la boucle de la région 3.2 de  $\sigma^S$  est plus flexible et peut occuper une position différente de celle de  $\sigma^{70}$ . Ces résultats permettent de dire que la conformation de la région 3.2 contribue à la haute sensibilité au froid et à une activité transcriptionnelle réduite d' $E\sigma^S$ . Nos résultats expliquent aussi la préférence de  $E\sigma^S$  pour les promoteurs qui ont un élément discriminateur riche en A / T. Ces promoteurs devraient diminuer le  $T_m$  de la formation de la bulle de transcription (Lee and Gralla, 2001; Typas et al., 2007).

La région 3.2 est placée près du groupe de mutations conférant la résistance à Lpm et elle interagit avec les éléments  $\beta'$ -SW2 et  $\beta'$ -Lid (Brodolin, 2011; Srivastava et al., 2011; Tupin et al., 2010a) (**Figure 24a et c**). Par sa position au niveau de la structure de l'ARNP, la région 3.2 peut influencer l'action de la Lpm de deux façons : en stabilisant le brin matrice dans le site actif et en interférant avec la fixation de la Lpm. Nous proposons un modèle dans lequel l'antibiotique limite le mouvement de la région 3.2 après l'entrée du brin matrice et perturbe les interactions entre ce dernier et l'élément  $\beta'$ -SW2. En conséquence, le brin matrice ne peut pas se maintenir au niveau du site actif et la bulle de transcription ne se forme pas (**Figure 41 et 44**). La flexibilité ou la mobilité de la région 3.2 pourrait agir sur la liaison du brin matrice ou sur la liaison de la Lpm à l'ARNP. Nos résultats confirment le mécanisme d'inhibition dans lequel Lpm cible la nucléation de la bulle de transcription au niveau de l'élément -10, cette nucléation étant dépendante du facteur sigma. Ils suggèrent également que la fixation du brin matrice à l'ARNP joue un rôle important dans ce processus (**Figure 44**).

Lors de la liaison au site actif de l'ARNP, Lpm et le brin matrice se heurtent inévitablement à la région 3.2. Ce heurt explique en partie comment la délétion ou un changement de conformation de la boucle peut augmenter la sensibilité de l'ARNP à l'antibiotique. Cependant, les études actuelles et celles précédemment publiées sur la titration avec Lpm, réalisée sur l'ADN scaffold synthétique (Tupin et al., 2010a) ont démontré que  $\sigma^{70}$  a seulement des effets marginaux sur l'affinité de Lpm à l'ARNP. Mais, quand le facteur sigma est impliqué dans la fusion du promoteur, la conformation de la région 3.2 affecte fortement l'activité de Lpm.

Les études actuelles nous ont permis de réviser le modèle précédemment proposé selon lequel l'antibiotique empêche la fixation stable du brin matrice dans le site actif de l'ARNP et selon lequel l'ADN aval se fixe dans le canal jaw/clamp en présence de Lpm quand la fusion du promoteur a été entièrement bloquée (Brodolin, 2011; Tupin et al., 2010a). Nous avons montré que les contacts entre l'ADN duplex aval et l'ARNP ne peuvent pas se former en présence de l'antibiotique et cela coïncide avec le manque d'ouverture de l'ADN.

En présence de la Lpm, l'ARNP se lie au promoteur seulement au niveau de l'élément -35 par la région 4.2 et en amont par  $\alpha$ -CTD, formant ainsi des complexes ressemblants à des complexes intermédiaires fermés de courte durée observés en temps réel dans les expériences de footprinting (Rogozina et al., 2009).

Nos résultats suggèrent que la reconnaissance de l'ADN du promoteur entre les positions -20 à +16 par l'holoenzyme et la formation de la bulle de transcription sont des événements étroitement liés. Cependant, les données actuelles ne nous ont pas permis de distinguer si la nucléation du promoteur nécessite l'entrée de l'ADN double brin du promoteur dans le site actif de l'ARNP modèle "bend-load-open" (Brodolin, 2011; Gries et al., 2010; Tupin et al., 2010a) ou bien si, inversement, la fusion est un préalable à l'entrée de l'ADN dans le site actif : modèle "open-bend-load" (Chen et al., 2010; Rogozina et al., 2009; Schroeder et al., 2007) Schroeder et d'autres., 2009).

La modélisation de Lpm dans le complexe ARNP en présence du promoteur (Zuo and Steitz, 2015) a montré que la fixation de Lpm est incompatible avec la fixation du brin matrice. Le mécanisme alternatif impliquerait que le site actif puisse accueillir Lpm et le brin matrice d'ADN. Nous privilégierons le mécanisme de compétition parce que, si on considère la taille de la molécule de Lpm (le MW 1058 Da, le volume 994 Å<sup>3</sup>), il reste peu d'espace dans la structure de complexe ouvert pour accueillir les deux ligands (**Figure 43**). Ainsi, nous proposons que, à la suite de la formation du RPo, Lpm entrerait en compétition avec le brin matrice et serait déplacée du site actif pour permettre la fixation de l'ADN (**Figure 41**).

Ce processus pourrait se produire soit directement, soit peut-être à la suite de changements de conformation de l'élément SW2 de l'ARNP induits par la fixation du brin matrice favorisant la dissociation de la Lpm. Quand la concentration locale de l'ADN dans le site actif n'est pas limitée par l'étape de la fusion du promoteur (mismatch-bubble), l'ADN l'emporte sur la Lpm. Dans le cas opposé, quand la disponibilité de l'ADN à se lier à l'ARNP dépend de la capacité de l'ARNP à initier la fusion et à tenir les brins d'ADN ouverts (ADN homoduplex), Lpm gagne la compétition.

La pertinence du modèle "de compétition " est renforcée par la stabilisation du brin matrice dans le site actif par les 7 nucléotides d'ARN amorce qui suppriment l'inhibition de la Lpm (Tupin et al., 2010a). Paradoxalement, la transcription à partir du scaffold synthétique contenant le brin matrice n'est pas limitée par l'ouverture de l'ADN, mais elle est inhibée par Lpm (Tupin et al., 2010a). En effet, la construction du scaffold ne contient pas la partie amont de la structure de jonction de la bulle de transcription qui joue un rôle clé dans la fusion du promoteur et dans la stabilisation de RPo (Guo and Gralla, 1998). Aussi, le brin matrice du scaffold serait faiblement lié au site actif de l'ARNP et ne peut pas entrer en compétition avec Lpm.

Finalement, notre étude a démontré que les antibiotiques naturels pourraient agir comme des répresseurs transcriptionnels spécifiques du facteur sigma agissant sur l'ADN de façon dépendante.

Les antibiotiques comme Lpm pourraient être utilisés comme des modèles pour le développement de molécules capables de cibler l'ARNP contrôlé par les sigmas alternatifs impliqués dans la pathogénicité et la virulence. De telles molécules pourraient avoir une large application dans les domaines médicaux, biotechnologiques et dans les sciences fondamentales. Le rôle de la Lpm ou d'autres antibiotiques visant l'élément switch dans la régulation de l'expression des gènes bactériens reste un sujet d'études futures.

## B. Perspectives

Dans cette étude, nous avons déterminé le rôle de la région 3.2 et de la région 1.2 dans la tolérance à la lipirmycine mais aucune équipe n'a encore réussi à cristalliser le complexe de l'ARNP avec la Lmp. Afin de déterminer précisément le mécanisme d'action et les transitions structurales impliquées, nous avons étudié l'organisation moléculaire du complexe formé par l'ARNP, le facteur sigma primaire et l'antibiotique par des approches structurales en combinant la cristallographie aux rayons X et la microscopie électronique (EM) et Cryo-EM. Nous envisageons également de réaliser les mêmes expériences avec le sigma alternatif. Ces travaux de cristallisation sont réalisés en collaboration avec le Dr. P. Bron (CBS, Montpellier).

Nous développons actuellement les méthodes de fluorescence et FRET pour l'étude des interactions de l'ARNP avec l'ADN par la méthode de cinétique rapide Stopped-Flow et par des expériences de footprint en temps réel en utilisant les installations de SOLEIL (synchrotron de Saclay) en collaboration avec le Dr. Bianca Sclavi (ENS, Cachan). Ces approches nous ont permis de déterminer le mécanisme d'action de la Lpm et les transitions structurales entre la protéine et l'ADN dans le complexe d'initiation de la transcription.

Les résultats de cette étude contribueront à la compréhension des bases moléculaires de la résistance aux antibiotiques ; ils fourniront une base pour le développement de nouveaux médicaments plus efficaces et feront progresser l'étude des mécanismes fondamentaux de la transcription. Les approches méthodologiques développées pendant ce travail pourront être étendues à l'analyse d'autres antibiotiques ciblant les ARNPs bactériennes et à d'autres facteurs de transcription.

# **MATERIELS ET METHODES**

## Simulations de dynamique moléculaire (DM)

La structure cristallographique de l'ARNP d'*E.coli* (4IGC) a été utilisée pour les simulations de DM et le docking. Tout d'abord les résidus manquants 330 à 346 de l'élément  $\beta'$ -SW2 ont été modélisés par homologie avec la structure de l'ARNP de *Thermus thermophilus* (4G7O) en utilisant le programme Chimera - UCSF (Pettersen et al., 2004).

Les substitutions D513K et  $\sigma^S$  des résidus 504 à 530 ont été introduites avec le module « rotamer » inclus dans le programme Chimera. La protéine a été immergée dans une boîte d'eau (modèle TIP3P) avec une épaisseur de 10 Å de chaque côté et la charge globale du système a été neutralisée par l'ajout des ions de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ . L'énergie potentielle du système hydraté a été minimisée par la méthode des gradients conjuguées (50.000 étapes avec un pas de 1 fs) implémentée dans NAMD v2.10 (Phillips et al., 2005) en utilisant le champ de force CHARMM (MacKerell et al., 2000-2001) et en conditions périodiques. Les simulations ont ensuite été réalisées au centre de calcul intensif [HPC@LR](#). La dynamique moléculaire a été initiée par une augmentation progressive de la température de 0 K à 300 K sous pression constante (1 atm, dynamique de Langevin) avec l'utilisation du piston de Langevin et l'effet Nosé-Hoover (Feller et al., 1995; Martyna et al., 1994). Un cutoff 12 Å a été défini pour les interactions van der Waals avec une fonction de commutation débutant à 10 Å.

L'algorithme PME (Particle Mesh Ewald) (Essmann et al., 1995) a été utilisé pour calculer les forces électrostatiques longue distance avec un espacement de 1 Å. Le système a ensuite été équilibré par 100.000 étapes avant l'étape de production (10 ns). Les trajectoires des simulations ont été analysées en utilisant le logiciel VMD (Humphrey et al., 1996).

## Docking

Les dockings moléculaires de Lpm ont été réalisés avec le programme GOLD 5.2 (Genetic Optimization for Ligand Docking) (Jones et al., 1997) sur un ordinateur Balde-IBM.

Les poses de docking (fixation de la Lpm) obtenues avec le programme GOLD ont été confirmées par l'utilisation d'un second programme « PLANTS » (Protein-Ligand ANT System) (Korb et al., 2009) mettant en œuvre un algorithme de recherche de solutions basé sur le cheminement des fourmis.

Le docking de la Lpm a été réalisé en utilisant 50 séries d'algorithmes génétiques centrées autour du carbone alpha du résidu R337 avec un rayon de recherche de 15 Å et un examen des cavités. Les prévisions de docking ont été effectuées en utilisant deux

conformations d'ARNP (après la minimisation de l'énergie et avant l'exécution de DM ou à la fin de DM).

Un docking additionnel a été réalisé en incluant plus de flexibilité (rotamères définis pour les chaînes latérales des résidus K334 et Q335 du  $\beta'$  switch 2 et celles de la région 3.2 D513, D514, E515). Les solutions de docking ont été classées en fonction du score généré par la fonction de score utilisée ou goldscore qui rassemblent l'ensemble des solutions par liaison directe avec la matrice des déviations (RMSD).

Les résultats ont été analysés à l'aide de l'interface graphique intégrée Hermes ou par VMD, ou en utilisant le programme PyMOL Molecular Graphics System (version 1.3, Schrödinger, LLC).

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## A

- Adelman, K., Yuzenkova, J., La Porta, A., Zenkin, N., Lee, J., Lis, J.T., Borukhov, S., Wang, M.D., Severinov, K., 2004. Molecular mechanism of transcription inhibition by peptide antibiotic Microcin J25. *Mol. Cell* 14, 753–762. doi:10.1016/j.molcel.2004.05.017
- AMR Review Paper - Tackling a crisis for the health and wealth of nations-
- Andre, E., 2006. Novel synthetic molecules targeting the bacterial RNA polymerase assembly. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 245–251. doi:10.1093/jac/dki426
- André, E., Bastide, L., Villain-Guillot, P., Latouche, J., Rouby, J., Leonetti, J.-P., 2004. A multiwell assay to isolate compounds inhibiting the assembly of the prokaryotic RNA polymerase. *Assay Drug Dev. Technol.* 2, 629–635. doi:10.1089/adt.2004.2.629
- Arhin, F., Bélanger, O., Ciblat, S., Dehbi, M., Delorme, D., Dietrich, E., Dixit, D., Lafontaine, Y., Lehoux, D., Liu, J., McKay, G.A., Moeck, G., Reddy, R., Rose, Y., Srikumar, R., Tanaka, K.S.E., Williams, D.M., Gros, P., Pelletier, J., Parr, T.R., Far, A.R., 2006. A new class of small molecule RNA polymerase inhibitors with activity against rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 5812–5832. doi:10.1016/j.bmc.2006.05.035
- ar-threats- <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013>
- Arthur, T.M., Anthony, L.C., Burgess, R.R., 2000. Mutational analysis of beta '260-309, a sigma 70 binding site located on *Escherichia coli* core RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 275, 23113–23119. doi:10.1074/jbc.M002040200
- Artsimovitch, I., Chu, C., Lynch, A.S., Landick, R., 2003. A new class of bacterial RNA polymerase inhibitor affects nucleotide addition. *Science* 302, 650–654. doi:10.1126/science.1087526
- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassylyeva, M.N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., Vassylyev, D.G., 2004. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* 117, 299–310.
- Artsimovitch, I., Seddon, J., Sears, P., 2012. Fidaxomicin Is an Inhibitor of the Initiation of Bacterial RNA Synthesis. *Clin. Infect. Dis.* 55, S127–S131. doi:10.1093/cid/cis358
- Artsimovitch, I., Svetlov, V., Nemetski, S.M., Epshtein, V., Cardozo, T., Nudler, E., 2011. Tagetitoxin inhibits RNA polymerase through trapping of the trigger loop. *J. Biol. Chem.* 286, 40395–40400. doi:10.1074/jbc.M111.300889
- Artsimovitch, I., Vassylyeva, M.N., Svetlov, D., Svetlov, V., Perederina, A., Igarashi, N., Matsugaki, N., Wakatsuki, S., Tahirov, T.H., 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. doi:10.1016/j.cell.2005.07.014
- Atkinson, G.C., Tenson, T., Hauryliuk, V., 2011. The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One* 6, e23479. doi:10.1371/journal.pone.0023479
- Ayers, D.G., Auble, D.T., deHaseth, P.L., 1989. Promoter recognition by *Escherichia coli* RNA polymerase. Role of the spacer DNA in functional complex formation. *J. Mol. Biol.* 207, 749–756.

## B

- Bacterial Resistance to Antibiotics [WWW Document], n.d. URL  
[http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial\\_3.html](http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html) (accessed 6.2.16).
- Bae, B., Davis, E., Brown, D., Campbell, E.A., Wigneshweraraj, S., Darst, S.A., 2013. Phage T7 Gp2 inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase involves misappropriation of 70 domain 1.1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 19772–19777. doi:10.1073/pnas.1314576110
- Bae, B., Feklistov, A., Lass-Napiorkowska, A., Landick, R., Darst, S.A., 2015. Structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme open promoter complex. *eLife* 4. doi:10.7554/eLife.08504
- Bai, H., Sang, G., You, Y., Xue, X., Zhou, Y., Hou, Z., Meng, J., Luo, X., 2012. Targeting RNA Polymerase Primary  $\sigma 70$  as a Therapeutic Strategy against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Antisense Peptide Nucleic Acid. *PLoS ONE* 7, e29886. doi:10.1371/journal.pone.0029886
- Baldwin, N.E., Dombroski, A.J., 2001. Isolation and characterization of mutations in region 1.2 of *Escherichia coli* sigma70. *Mol. Microbiol.* 42, 427–437.
- Barne, K.A., Bown, J.A., Busby, S.J.W., Minchin, S.D., 1997. Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma 70$  subunit is responsible for the recognition of the “extended -10” motif at promoters. *EMBO J.* 16, 4034–4040. doi:10.1093/emboj/16.13.4034
- Bashyam, M.D., Tyagi, A.K., 1998. Identification and analysis of “extended -10” promoters from mycobacteria. *J. Bacteriol.* 180, 2568–2573.
- Basu, R.S., Warner, B.A., Molodtsov, V., Pupov, D., Esyunina, D., Fernández-Tornero, C., Kulbachinskiy, A., Murakami, K.S., 2014. Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 289, 24549–24559. doi:10.1074/jbc.M114.584037
- Belogurov, G.A., Vassilyeva, M.N., Sevostyanova, A., Appleman, J.R., Xiang, A.X., Lira, R., Webber, S.E., Klyuyev, S., Nudler, E., Artsimovitch, I., Vassilyev, D.G., 2009. Transcription inactivation through local refolding of the RNA polymerase structure. *Nature* 457, 332–335. doi:10.1038/nature07510
- Bernardo, L.M.D., Johansson, L.U.M., Solera, D., Skärfstad, E., Shingler, V., 2006. The guanosine tetraphosphate (ppGpp) alarmone, DksA and promoter affinity for RNA polymerase in regulation of sigma-dependent transcription. *Mol. Microbiol.* 60, 749–764. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05129.x
- Beutler, J.A., 2009. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. *Curr. Protoc. Pharmacol.* Editor. Board SJ Enna Ed.--Chief AI 46, 9.11.1-9.11.21. doi:10.1002/0471141755.ph0911s46
- Blankschien, M.D., Lee, J.-H., Grace, E.D., Lennon, C.W., Halliday, J.A., Ross, W., Gourse, R.L., Herman, C., 2009. Super DksAs: substitutions in DksA enhancing its effects on transcription initiation. *EMBO J.* 28, 1720–1731. doi:10.1038/emboj.2009.126
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y., 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453–1462.

- Bochkareva, A., Zenkin, N., 2013. The  $\sigma 70$  region 1.2 regulates promoter escape by unwinding DNA downstream of the transcription start site. *Nucleic Acids Res.* 41, 4565–4572. doi:10.1093/nar/gkt116
- Bown, J.A., Owens, J.T., Meares, C.F., Fujita, N., Ishihama, A., Busby, S.J., Minchin, S.D., 1999. 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.* 274, 2263–2270.
- Brennan, C.A., Dombroski, A.J., Platt, T., 1987. Transcription termination factor rho is an RNA-DNA helicase. *Cell* 48, 945–952.
- Brodolin, K., 2013. Antibiotics Targeting Bacterial RNA Polymerase, in: Gualerzi, C.O., Brandi, L., Fabbretti, A., Pon, C.L. (Eds.), *Antibiotics*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 299–321.
- Brodolin, K., 2011. Antibiotics trapping transcription initiation intermediates: To melt or to bend, what's first? *Transcription* 2, 60–65. doi:10.4161/trns.2.2.14366
- Brodolin, K., Zenkin, N., Mustaev, A., Mamaeva, D., Heumann, H., 2004. The sigma 70 subunit of RNA polymerase induces lacUV5 promoter-proximal pausing of transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 551–557. doi:10.1038/nsmb768
- Brodolin, K., Zenkin, N., 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. doi:10.1016/j.jmb.2005.05.048
- Browning, D.F., Busby, S.J., 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 57–65. doi:10.1038/nrmicro787
- Bryskier, A., 1999. New research in macrolides and ketolides since 1997. *Expert Opin. Investig. Drugs* 8, 1171–1194. doi:10.1517/13543784.8.8.1171
- Buc, H., 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 (Mosc.)* 24, 2712–2723.
- Buck, M., Gallegos, M.T., Studholme, D.J., Guo, Y., Gralla, J.D., 2000. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J. Bacteriol.* 182, 4129–4136.
- Busby, S., Ebright, R.H., 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 79, 743–746.

## C

- Calvori, C., Frontali, L., Leoni, L., Tecce, G., 1965. Effect of rifamycin on protein synthesis. *Nature* 207, 417–418.
- Camacho, A., Salas, M., 1999. Effect of mutations in the “extended -10” motif of three *Bacillus subtilis* sigmaA-RNA polymerase-dependent promoters. *J. Mol. Biol.* 286, 683–693. doi:10.1006/jmbi.1998.2526
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S.A., 2001. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. *Cell* 104, 901–912.
- Campbell, E.A., Muzzin, O., Chlenov, M., Sun, J.L., Olson, C.A., Weinman, O., Trester-Zedlitz, M.L., Darst, S.A., 2002. Structure of the Bacterial RNA Polymerase Promoter Specificity  $\sigma$  Subunit. *Mol. Cell* 9, 527–539. doi:10.1016/S1097-2765(02)00470-7

- Campbell, E.A., Pavlova, O., Zenkin, N., Leon, F., Irschik, H., Jansen, R., Severinov, K., Darst, S.A., 2005. Structural, functional, and genetic analysis of sorangicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *EMBO J.* 24, 674–682. doi:10.1038/sj.emboj.7600499
- Campbell, E.A., Tupy, J.L., Gruber, T.M., Wang, S., Sharp, M.M., Gross, C.A., Darst, S.A., 2003. Crystal structure of *Escherichia coli* sigmaE with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA. *Mol. Cell* 11, 1067–1078.
- Carpousis, A.J., Gralla, J.D., 1980. Cycling of ribonucleic acid polymerase to produce oligonucleotides during initiation in vitro at the lac UV5 promoter. *Biochemistry (Mosc.)* 19, 3245–3253.
- Cashel, M., 1969. The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. IV. Relevance of unusual phosphorylated compounds from amino acid-starved stringent strains. *J. Biol. Chem.* 244, 3133–3141.
- Cashel, M., Hsu, L.M., Hernandez, V.J., 2003. Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* sigma 70 reduce abortive transcription and enhance promoter escape. *J. Biol. Chem.* 278, 5539–5547. doi:10.1074/jbc.M211430200
- Cassani, G., Burgess, R.R., Goodman, H.M., Gold, L., 1971. Inhibition of RNA polymerase by streptolydigin. *Nature. New Biol.* 230, 197–200.
- Chakraborty, A., Wang, D., Ebright, Y.W., Korlann, Y., Kortkhonjia, E., Kim, T., Chowdhury, S., Wigneshweraraj, S., Irschik, H., Jansen, R., Nixon, B.T., Knight, J., Weiss, S., Ebright, R.H., 2012. Opening and closing of the bacterial RNA polymerase clamp. *Science* 337, 591–595. doi:10.1126/science.1218716
- Chen, J., Darst, S.A., Thirumalai, D., 2010. Promoter melting triggered by bacterial RNA polymerase occurs in three steps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 12523–12528. doi:10.1073/pnas.1003533107
- Ciciliato, I., Corti, E., Sarubbi, E., Stefanelli, S., Gastaldo, L., Montanini, N., Kurz, M., Losi, D., Marinelli, F., Selva, E., 2004. Antibiotics GE23077, novel inhibitors of bacterial RNA polymerase. I. Taxonomy, isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* 57, 210–217.
- Colland, F., Fujita, N., Kotlarz, D., Bown, J.A., Meares, C.F., Ishihama, A., Kolb, A., 1999. Positioning of sigma(S), the stationary phase sigma factor, in *Escherichia coli* RNA polymerase-promoter open complexes. *EMBO J.* 18, 4049–4059. doi:10.1093/emboj/18.14.4049
- Cook, H., Ussery, D.W., 2013. Sigma factors in a thousand *E. coli* genomes. *Environ. Microbiol.* 15, 3121–3129. doi:10.1111/1462-2920.12236
- Coronelli, C., White, R.J., Lancini, G.C., Parenti, F., 1975. Lipiarmycin, a new antibiotic from *Actinoplanes*. II. Isolation, chemical, biological and biochemical characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28, 253–259.
- Costanzo, A., Nicoloff, H., Barchinger, S.E., Banta, A.B., Gourse, R.L., Ades, S.E., 2008. ppGpp and DksA likely regulate the activity of the extracytoplasmic stress factor sigmaE in *Escherichia coli* by both direct and indirect mechanisms. *Mol. Microbiol.* 67, 619–632. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06072.x
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnatt, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R., Kornberg, R.D., 2000. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science* 288, 640–649.
- Crum, G.F., Devries, W.H., Eble, T.E., Large, C.M., Shell, J.W., 1955. Streptolydigin, a new antimicrobial antibiotic. II. Isolation and characterization. *Antibiot. Annu.* 3, 893–896.

## D

- Dalebroux, Z.D., Svensson, S.L., Gaynor, E.C., Swanson, M.S., 2010. ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 74, 171–199. doi:10.1128/MMBR.00046-09
- Darst, S.A., 2004. New inhibitors targeting bacterial RNA polymerase. *Trends Biochem. Sci.* 29, 159–160. doi:10.1016/j.tibs.2004.02.005
- Darst, S.A., Feklistov, A., Gross, C.A., 2014. Promoter melting by an alternative  $\sigma$ , one base at a time. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 350–351. doi:10.1038/nsmb.2798
- Darst, S.A., Kubalek, E.W., Kornberg, R.D., 1989. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme determined by electron crystallography. *Nature* 340, 730–732. doi:10.1038/340730a0
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 74, 417–433. doi:10.1128/MMBR.00016-10
- Deboer, C., Dietz, A., Savage, G.M., Silver, W.S., 1955. Streptolydigin, a new antimicrobial antibiotic. I. Biologic studies of streptolydigin. *Antibiot. Annu.* 3, 886–892.
- Degen, D., Feng, Y., Zhang, Y., Ebricht, K.Y., Ebricht, Y.W., Gigliotti, M., Vahedian-Movahed, H., Mandal, S., Talaue, M., Connell, N., Arnold, E., Fenical, W., Ebricht, R.H., 2014. Transcription inhibition by the depsipeptide antibiotic salinamide A. *eLife* 3. doi:10.7554/eLife.02451
- Delgado, M.A., Rintoul, M.R., Farías, R.N., Salomón, R.A., 2001. *Escherichia coli* RNA polymerase is the target of the cyclopeptide antibiotic microcin J25. *J. Bacteriol.* 183, 4543–4550. doi:10.1128/JB.183.15.4543-4550.2001
- Denapoli, J., Tehranchi, A.K., Wang, J.D., 2013. Dose-dependent reduction of replication elongation rate by (p)ppGpp in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 88, 93–104. doi:10.1111/mmi.12172
- Doniselli, N., Rodriguez-Aliaga, P., Amidani, D., Bardales, J.A., Bustamante, C., Guerra, D.G., Rivetti, C., 2015. New insights into the regulatory mechanisms of ppGpp and DksA on *Escherichia coli* RNA polymerase-promoter complex. *Nucleic Acids Res.* 43, 5249–5262. doi:10.1093/nar/gkv391
- Doundoulakis, T., Xiang, A.X., Lira, R., Agrios, K.A., Webber, S.E., Sisson, W., Aust, R.M., Shah, A.M., Showalter, R.E., Appleman, J.R., Simonsen, K.B., 2004. Myxopyronin B analogs as inhibitors of RNA polymerase, synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 5667–5672. doi:10.1016/j.bmcl.2004.08.045
- Drennan, A., Kraemer, M., Capp, M., Gries, T., Ruff, E., Sheppard, C., Wigneshweraraj, S., Artsimovitch, I., Record, M.T., 2012. Key roles of the downstream mobile jaw of *Escherichia coli* RNA polymerase in transcription initiation. *Biochemistry (Mosc.)* 51, 9447–9459. doi:10.1021/bi301260u
- Dufour, N., Debarbieux, L., Fromentin, M., Ricard, J.-D., 2015. Treatment of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Pneumonia With Bacteriophages. *Crit. Care Med.* 43, e190-198. doi:10.1097/CCM.0000000000000968
- Durfee, T., Hansen, A.-M., Zhi, H., Blattner, F.R., Jin, D.J., 2008. Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 1084–1096. doi:10.1128/JB.01092-07

## E

- Epshtein, V., Cardinale, C.J., Ruckenstein, A.E., Borukhov, S., Nudler, E., 2007. An allosteric path to transcription termination. *Mol. Cell* 28, 991–1001.  
doi:10.1016/j.molcel.2007.10.011
- Erol, O., Schäberle, T.F., Schmitz, A., Rachid, S., Gurgui, C., El Omari, M., Lohr, F., Kehraus, S., Piel, J., Müller, R., König, G.M., 2010. Biosynthesis of the myxobacterial antibiotic corallopyronin A. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* 11, 1253–1265.  
doi:10.1002/cbic.201000085
- Estrem, S.T., Gaal, T., Ross, W., Gourse, R.L., 1998. Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9761–9766.

## F

- Feklistov, A., Darst, S.A., 2011. Structural basis for promoter-10 element recognition by the bacterial RNA polymerase  $\sigma$  subunit. *Cell* 147, 1257–1269.  
doi:10.1016/j.cell.2011.10.041
- 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 Mg<sup>2+</sup> to the RNA polymerase active center. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14820–14825. doi:10.1073/pnas.0802822105
- Feklistov, A., Sharon, B.D., Darst, S.A., Gross, C.A., 2014a. Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 357–376.  
doi:10.1146/annurev-micro-092412-155737
- Feklistov, A., Sharon, B.D., Darst, S.A., Gross, C.A., 2014b. Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 357–376.  
doi:10.1146/annurev-micro-092412-155737
- Feng, Y., Degen, D., Wang, X., Gigliotti, M., Liu, S., Zhang, Y., Das, D., Michalchuk, T., Ebright, Y.W., Talaue, M., Connell, N., Ebright, R.H., 2015. Structural Basis of Transcription Inhibition by CBR Hydroxamidines and CBR Pyrazoles. *Structure* 23, 1470–1481.  
doi:10.1016/j.str.2015.06.009
- Feng, Y., Zhang, Y., Ebright, R.H., 2016. Structural basis of transcription activation. *Science* 352, 1330–1333. doi:10.1126/science.aaf4417
- Fenton, M.S., Lee, S.J., Gralla, J.D., 2000. Escherichia coli promoter opening and -10 recognition: mutational analysis of sigma70. *EMBO J.* 19, 1130–1137.  
doi:10.1093/emboj/19.5.1130
- Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S., Trevino, E., 1998. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 10th edition. ed. Mosby-Year Book, St. Louis.

- Fruth, M., Plaza, A., Hinsberger, S., Sahner, J.H., Haupenthal, J., Bischoff, M., Jansen, R., Müller, R., Hartmann, R.W., 2014. Binding mode characterization of novel RNA polymerase inhibitors using a combined biochemical and NMR approach. *ACS Chem. Biol.* 9, 2656–2663. doi:10.1021/cb5005433
- Furman, R., Danhart, E.M., NandyMazumdar, M., Yuan, C., Foster, M.P., Artsimovitch, I., 2015. pH dependence of the stress regulator DksA. *PLoS One* 10, e0120746. doi:10.1371/journal.pone.0120746

## G

- Gaal, T., Ross, W., Estrem, S.T., Nguyen, L.H., Burgess, R.R., Gourse, R.L., 2001. Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* 42, 939–954.
- Geszvain, K., Gruber, T.M., Mooney, R.A., Gross, C.A., Landick, R., 2004. A hydrophobic patch on the flap-tip helix of E.coli RNA polymerase mediates sigma(70) region 4 function. *J. Mol. Biol.* 343, 569–587. doi:10.1016/j.jmb.2004.08.063
- Ghosh, T., Bose, D., Zhang, X., 2010. Mechanisms for activating bacterial RNA polymerase. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 611–627. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00239.x
- Giguère, S., 2013. Antimicrobial Drug Action and Interaction, in: *Medicine, S.G.D., , DACVIMessor, Large Animal Internal, VetMB,essor, J.F.P., Pharmacology, P.M.D.D., MS, DACVIM, DACVCPessor, Veterinary Clinical (Eds.), Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* John Wiley & Sons, Inc, pp. 1–10.
- Glaus, F., Altmann, K.-H., 2015. Total synthesis of the tiacumicin B (lipiarmycin A3/fidaxomicin) aglycone. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 54, 1937–1940. doi:10.1002/anie.201409510
- Glaus, F., Altmann, K.-H., 2012. Total synthesis of the bacterial RNA polymerase inhibitor ripostatin B. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 51, 3405–3409. doi:10.1002/anie.201200871
- Goldman, S.R., Ebright, R.H., Nickels, B.E., 2009. Direct detection of abortive RNA transcripts in vivo. *Science* 324, 927–928. doi:10.1126/science.1169237
- Gopalkrishnan, S., Nicoloff, H., Ades, S.E., 2014. Co-ordinated regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, with other Escherichia coli sigma factors by (p)ppGpp and DksA may be achieved by specific regulation of individual holoenzymes. *Mol. Microbiol.* 93, 479–493. doi:10.1111/mmi.12674
- Gourse, R.L., Gaal, T., Bartlett, M.S., Appleman, J.A., Ross, W., 1996. rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in Escherichia coli. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 645–677. doi:10.1146/annurev.micro.50.1.645
- Gourse, R.L., Ross, W., Gaal, T., 2000. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol. Microbiol.* 37, 687–695.
- Gries, T.J., Kontur, W.S., Capp, M.W., Saecker, R.M., Record, M.T., 2010. 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.* 107, 10418–10423. doi:10.1073/pnas.1000967107
- Gruber, T.M., Bryant, D.A., 1997. Molecular systematic studies of eubacteria, using sigma70-type sigma factors of group 1 and group 2. *J. Bacteriol.* 179, 1734–1747.

- Gruber, T.M., Gross, C.A., 2003. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 441–466. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090913
- Gruber, T.M., Markov, D., Sharp, M.M., Young, B.A., Lu, C.Z., Zhong, H.J., Artsimovitch, I., Geszvain, K.M., Arthur, T.M., Burgess, R.R., Landick, R., Severinov, K., Gross, C.A., 2001. Binding of the initiation factor sigma(70) to core RNA polymerase is a multistep process. *Mol. Cell* 8, 21–31.
- Gualtieri, M., Bastide, L., Villain-Guillot, P., Michaux-Charachon, S., Latouche, J., Leonetti, J.-P., 2006a. In vitro activity of a new antibacterial rhodanine derivative against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 778–783. doi:10.1093/jac/dkl314
- Gualtieri, M., Tupin, A., Brodolin, K., Leonetti, J.-P., 2009. Frequency and characterisation of spontaneous lipiarmycin-resistant *Enterococcus faecalis* mutants selected in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 605–606. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.07.003
- Gualtieri, M., Villain-Guillot, P., Latouche, J., Leonetti, J.-P., Bastide, L., 2006b. Mutation in the *Bacillus subtilis* RNA polymerase beta' subunit confers resistance to lipiarmycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 401–402. doi:10.1128/AAC.50.1.401-402.2006
- Guo, Y., Gralla, J.D., 1998. Promoter opening via a DNA fork junction binding activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11655–11660.

## H

- Haugen, S.P., Berkmen, M.B., Ross, W., Gaal, T., Ward, C., Gourse, R.L., 2006. rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell* 125, 1069–1082. doi:10.1016/j.cell.2006.04.034
- Haugen, S.P., Ross, W., Gourse, R.L., 2008. Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 507–519. doi:10.1038/nrmicro1912
- Hayward, R.S., Igarashi, K., Ishihama, A., 1991. Functional specialization within the alpha-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 221, 23–29.
- Heisler, L.M., Suzuki, H., Landick, R., Gross, C.A., 1993. Four contiguous amino acids define the target for streptolydigin resistance in the beta subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 268, 25369–25375.
- Helmann, J.D., Chamberlin, M.J., 1988. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 839–872. doi:10.1146/annurev.bi.57.070188.004203
- Hook-Barnard, I.G., Hinton, D.M., 2007. Transcription initiation by mix and match elements: flexibility for polymerase binding to bacterial promoters. *Gene Regul. Syst. Biol.* 1, 275–293.
- Huang, D.B., DuPont, H.L., 2005. Rifaximin--a novel antimicrobial for enteric infections. *J. Infect.* 50, 97–106. doi:10.1016/j.jinf.2004.05.019
- Hüsecken, K., Negri, M., Fruth, M., Boettcher, S., Hartmann, R.W., Haupenthal, J., 2013. Peptide-based investigation of the *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma(70)$ :core interface as target site. *ACS Chem. Biol.* 8, 758–766. doi:10.1021/cb3005758

## I

- Irschik, H., Augustiniak, H., Gerth, K., Höfle, G., Reichenbach, H., 1995. The ripostatins, novel inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *J. Antibiot. (Tokyo)* 48, 787–792.
- Irschik, H., Gerth, K., Höfle, G., Kohl, W., Reichenbach, H., 1983. The myxopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *J. Antibiot. (Tokyo)* 36, 1651–1658.
- Irschik, H., Jansen, R., Gerth, K., Höfle, G., Reichenbach, H., 1987. The sorangicins, novel and powerful inhibitors of eubacterial RNA polymerase isolated from myxobacteria. *J. Antibiot. (Tokyo)* 40, 7–13.
- Irschik, H., Jansen, R., Höfle, G., Gerth, K., Reichenbach, H., 1985. The coralopyronins, new inhibitors of bacterial RNA synthesis from Myxobacteria. *J. Antibiot. (Tokyo)* 38, 145–152.
- Ishihama, A., 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 499–518. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.499

## J

- Jacoby, G.A., 1994. Extrachromosomal resistance in gram-negative organisms: the evolution of beta-lactamase. *Trends Microbiol.* 2, 357–360.
- Jansen, R., Schummer, D., Irschik, H., Höfle, G., 1990. Antibiotics from gliding bacteria, XLII. Chemical modification of sorangicin A and structure — Activity relationship I: Carboxyl and hydroxyl group derivatives. *Liebigs Ann. Chem.* 1990, 975–988. doi:10.1002/jlac.1990199001178
- Jin, D.J., Turnbough, C.L., 1994. An *Escherichia coli* RNA polymerase defective in transcription due to its overproduction of abortive initiation products. *J. Mol. Biol.* 236, 72–80. doi:10.1006/jmbi.1994.1119
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., Nyström, T., 2002. Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev.* 16, 1260–1270. doi:10.1101/gad.227902
- Johnston, E.B., Lewis, P.J., Griffith, R., 2009. The interaction of *Bacillus subtilis* sigmaA with RNA polymerase. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 18, 2287–2297. doi:10.1002/pro.239
- Juang, Y.L., Helmann, J.D., 1994. A promoter melting region in the primary sigma factor of *Bacillus subtilis*. Identification of functionally important aromatic amino acids. *J. Mol. Biol.* 235, 1470–1488. doi:10.1006/jmbi.1994.1102

## K

- Kandemir, H., Ma, C., Kutty, S.K., Black, D.S., Griffith, R., Lewis, P.J., Kumar, N., 2014. Synthesis and biological evaluation of 2,5-di(7-indolyl)-1,3,4-oxadiazoles, and 2- and 7-indolyl 2-(1,3,4-thiadiazolyl)ketones as antimicrobials. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 1672–1679. doi:10.1016/j.bmc.2014.01.025
- Kanjee, U., Ogata, K., Houry, W.A., 2012. Direct binding targets of the stringent response alarmone (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* 85, 1029–1043. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08177.x
- Kapanidis, A.N., Margeat, E., Ho, S.O., Kortkhonjia, E., Weiss, S., Ebright, R.H., 2006. Initial transcription by RNA polymerase proceeds through a DNA-scrunching mechanism. *Science* 314, 1144–1147. doi:10.1126/science.1131399
- Kapanidis, A.N., Margeat, E., Laurence, T.A., Doose, S., Ho, S.O., Mukhopadhyay, J., Kortkhonjia, E., Mekler, V., Ebright, R.H., Weiss, S., 2005. Retention of transcription initiation factor sigma70 in transcription elongation: single-molecule analysis. *Mol. Cell* 20, 347–356. doi:10.1016/j.molcel.2005.10.012
- Kaufmann, E., Hattori, H., Miyatake-Ondozabal, H., Gademann, K., 2015. Total Synthesis of the Glycosylated Macrolide Antibiotic Fidaxomicin. *Org. Lett.* 17, 3514–3517. doi:10.1021/acs.orglett.5b01602
- Keilty, S., Rosenberg, M., 1987. Constitutive function of a positively regulated promoter reveals new sequences essential for activity. *J. Biol. Chem.* 262, 6389–6395.
- Kenney, T.J., York, K., Youngman, P., Moran, C.P., 1989. 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.* 86, 9109–9113.
- Klyuyev, S., Vassilyev, D.G., 2012. The binding site and mechanism of the RNA polymerase inhibitor tagetitoxin: an issue open to debate. *Transcription* 3, 46–50. doi:10.4161/trns.19468
- Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Epp, S.F., Pechere, J.C., 1999. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 424–427.
- Kontur, W.S., Saecker, R.M., Capp, M.W., Record, M.T., 2008. Late steps in the formation of *E. coli* RNA polymerase-lambda P R promoter open complexes: characterization of conformational changes by rapid [perturbant] upshift experiments. *J. Mol. Biol.* 376, 1034–1047. doi:10.1016/j.jmb.2007.11.064
- Koo, B.-M., Rhodius, V.A., Nonaka, G., deHaseth, P.L., Gross, C.A., 2009. Reduced capacity of alternative sigmas to melt promoters ensures stringent promoter recognition. *Genes Dev.* 23, 2426–2436. doi:10.1101/gad.1843709
- Korb, O., Stützle, T., Exner, T.E., 2009. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.* 49, 84–96. doi:10.1021/ci800298z
- Kostrewa, D., Zeller, M.E., Armache, K.-J., Seizl, M., Leike, K., Thomm, M., Cramer, P., 2009. RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature* 462, 323–330. doi:10.1038/nature08548
- Kriel, A., Bittner, A.N., Kim, S.H., Liu, K., Tehranchi, A.K., Zou, W.Y., Rendon, S., Chen, R., Tu, B.P., Wang, J.D., 2012. Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. *Mol. Cell* 48, 231–241. doi:10.1016/j.molcel.2012.08.009

- Kulbachinskiy, A., 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. doi:10.1074/jbc.C600060200
- 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., 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. doi:10.1093/jac/dkn269
- Kusano, S., Ding, Q., Fujita, N., Ishihama, A., 1996. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 70 and E sigma 38 holoenzymes. Effect of DNA supercoiling. *J. Biol. Chem.* 271, 1998–2004.
- Kyzer, S., Zhang, J., Landick, R., 2005. Inhibition of RNA polymerase by streptolydigin: no cycling allowed. *Cell* 122, 494–496. doi:10.1016/j.cell.2005.08.008

## L

- Lee, J.-H., Lennon, C.W., Ross, W., Gourse, R.L., 2012. Role of the Coiled-Coil Tip of *Escherichia coli* DksA in Promoter Control. *J. Mol. Biol.* 416, 503–517. doi:10.1016/j.jmb.2011.12.028
- Lee, S.J., Gralla, J.D., 2002. Promoter use by sigma 38 (rpoS) RNA polymerase. Amino acid clusters for DNA binding and isomerization. *J. Biol. Chem.* 277, 47420–47427. doi:10.1074/jbc.M208363200
- Lee, S.J., Gralla, J.D., 2001. Sigma38 (rpoS) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. *J. Biol. Chem.* 276, 30064–30071. doi:10.1074/jbc.M102886200
- Leitich, J., Oppolzer, W., Prelog, V., 1964. [On the configuration of rifamycin B and related rifamycins]. *Experientia* 20, 343–344.
- Lennon, C.W., Ross, W., Martin-Tumasch, S., Touloukhonov, I., Vrentas, C.E., Rutherford, S.T., Lee, J.-H., Butcher, S.E., Gourse, R.L., 2012. Direct interactions between the coiled-coil tip of DksA and the trigger loop of RNA polymerase mediate transcriptional regulation. *Genes Dev.* 26, 2634–2646. doi:10.1101/gad.204693.112
- Lewis, C., Nikitas, C.T., Schwartz, D.F., Wilkins, J.R., 1955. Streptolydigin, a new antimicrobial antibiotic. III. In vitro and in vivo laboratory studies. *Antibiot. Annu.* 3, 897–902.
- Li, J.W.-H., Vederas, J.C., 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325, 161–165. doi:10.1126/science.1168243
- Lim, H.M., Lee, H.J., Roy, S., Adhya, S., 2001. A “master” in base unpairing during isomerization of a promoter upon RNA polymerase binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14849–14852. doi:10.1073/pnas.261517398
- Lira, R., Xiang, A.X., Doundoulakis, T., Biller, W.T., Agrios, K.A., Simonsen, K.B., Webber, S.E., Sisson, W., Aust, R.M., Shah, A.M., Showalter, R.E., Banh, V.N., Steffy, K.R., Appleman, J.R., 2007. Syntheses of novel myxopyronin B analogs as potential inhibitors of bacterial RNA polymerase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 6797–6800. doi:10.1016/j.bmcl.2007.10.017
- Livermore, D.M., British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party on The Urgent Need: Regenerating Antibacterial Drug Discovery and Development, 2011. *Discovery*

- research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1941–1944. doi:10.1093/jac/dkr262
- Loewen, P.C., Hengge-Aronis, R., 1994. The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 53–80. doi:10.1146/annurev.mi.48.100194.000413
- Lonetto, M., Gribskov, M., Gross, C.A., 1992. The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* 174, 3843–3849.
- Lowery-Goldhammer, C., Richardson, J.P., 1974. An RNA-dependent nucleoside triphosphate phosphohydrolase (ATPase) associated with rho termination factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 2003–2007.

## M

- Ma, C., Yang, X., Kandemir, H., Mielczarek, M., Johnston, E.B., Griffith, R., Kumar, N., Lewis, P.J., 2013. Inhibitors of bacterial transcription initiation complex formation. *ACS Chem. Biol.* 8, 1972–1980. doi:10.1021/cb400231p
- Ma, C., Yang, X., Lewis, P.J., 2016. Bacterial Transcription Inhibitor of RNA Polymerase Holoenzyme Formation by Structure-Based Drug Design: From in Silico Screening to Validation. *ACS Infect. Dis.* 2, 39–46. doi:10.1021/acsinfecdis.5b00058
- Magnusson, L.U., Nystrom, T., Farewell, A., 2003. Underproduction of sigma 70 mimics a stringent response. A proteome approach. *J. Biol. Chem.* 278, 968–973. doi:10.1074/jbc.M209881200
- Malhotra, A., Severinova, E., Darst, S.A., 1996. Crystal structure of a sigma 70 subunit fragment from *E. coli* RNA polymerase. *Cell* 87, 127–136.
- Malinen, A.M., Nandymazumdar, M., Turtola, M., Malmi, H., Grocholski, T., Artsimovitch, I., Belogurov, G.A., 2014. CBR antimicrobials alter coupling between the bridge helix and the  $\beta$  subunit in RNA polymerase. *Nat. Commun.* 5, 3408. doi:10.1038/ncomms4408
- Malinen, A.M., Turtola, M., Parthiban, M., Vainonen, L., Johnson, M.S., Belogurov, G.A., 2012. Active site opening and closure control translocation of multisubunit RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 40, 7442–7451. doi:10.1093/nar/gks383
- Mariani, R., Granata, G., Maffioli, S.I., Serina, S., Brunati, C., Sosio, M., Marazzi, A., Vannini, A., Patel, D., White, R., Ciabatti, R., 2005. Antibiotics GE23077, novel inhibitors of bacterial RNA polymerase. Part 3: Chemical derivatization. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 3748–3752. doi:10.1016/j.bmcl.2005.05.060
- Mariner, K., McPhillie, M., Trowbridge, R., Smith, C., O’Neill, A.J., Fishwick, C.W.G., Chopra, I., 2011. Activity of and Development of Resistance to Coralopyronin A, an Inhibitor of RNA Polymerase $\nabla$ . *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2413–2416. doi:10.1128/AAC.01742-10
- Markov, D., Naryshkina, T., Mustaev, A., Severinov, K., 1999. A zinc-binding site in the largest subunit of DNA-dependent RNA polymerase is involved in enzyme assembly. *Genes Dev.* 13, 2439–2448.
- Martin, C.T., Muller, D.K., Coleman, J.E., 1988. Processivity in early stages of transcription by T7 RNA polymerase. *Biochemistry (Mosc.)* 27, 3966–3974.
- Masahiko Imashimizu, Nobuo Shimamoto, Taku Oshima, Mikhail Kashlev, 2014. Transcription elongation. *Transcr.* 2154-1264 5, 1–10. doi:10.4161/trns.28285
- Mathews, D.E., Durbin, R.D., 1990. Tagetitoxin inhibits RNA synthesis directed by RNA polymerases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265, 493–498.

- Mauri, M., Klumpp, S., 2014. A model for sigma factor competition in bacterial cells. *PLoS Comput. Biol.* 10, e1003845. doi:10.1371/journal.pcbi.1003845
- McClure, W.R., Cech, C.L., 1978. On the mechanism of rifampicin inhibition of RNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 253, 8949–8956.
- Mechold, U., Potrykus, K., Murphy, H., Murakami, K.S., Cashel, M., 2013. Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 41, 6175–6189. doi:10.1093/nar/gkt302
- Miao, S., Anstee, M.R., LaMarco, K., Matthew, J., Huang, L.H.T., Brasseur, M.M., 1997. Inhibition of Bacterial RNA Polymerases. Peptide Metabolites from the Cultures of *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.* 60, 858–861. doi:10.1021/np960709c
- Mielczarek, M., Devakaram, R.V., Ma, C., Yang, X., Kandemir, H., Purwono, B., Black, D.S., Griffith, R., Lewis, P.J., Kumar, N., 2014. Synthesis and biological activity of novel bis-indole inhibitors of bacterial transcription initiation complex formation. *Org. Biomol. Chem.* 12, 2882–2894. doi:10.1039/c4ob000460d
- Milon, P., Tischenko, E., Tomsic, J., Caserta, E., Folkers, G., La Teana, A., Rodnina, M.V., Pon, C.L., Boelens, R., Gualerzi, C.O., 2006. The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13962–13967. doi:10.1073/pnas.0606384103
- Miropolskaya, N., Ignatov, A., Bass, I., Zhilina, E., Pupov, D., Kulbachinskiy, A., 2012. Distinct functions of regions 1.1 and 1.2 of RNA polymerase  $\sigma$  subunits from *Escherichia coli* and *Thermus aquaticus* in transcription initiation. *J. Biol. Chem.* 287, 23779–23789. doi:10.1074/jbc.M112.363242
- Mooney, R.A., Davis, S.E., Peters, J.M., Rowland, J.L., Ansari, A.Z., Landick, R., 2009. Regulator trafficking on bacterial transcription units in vivo. *Mol. Cell* 33, 97–108. doi:10.1016/j.molcel.2008.12.021
- Moore, B.S., Trischman, J.A., Seng, D., Kho, D., Jensen, P.R., Fenical, W., 1999. Salinamides, Antiinflammatory Depsipeptides from a Marine *Streptomyces*. *J. Org. Chem.* 64, 1145–1150. doi:10.1021/jo9814391
- Morichaud, Z., Chaloin, L., Brodolin, K., 2016. Regions 1.2 and 3.2 of the RNA Polymerase  $\sigma$  Subunit Promote DNA Melting and Attenuate Action of the Antibiotic Lipiarmycin. *J. Mol. Biol.* 428, 463–476. doi:10.1016/j.jmb.2015.12.017
- 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, R.H., 2008. The RNA polymerase “switch region” is a target for inhibitors. *Cell* 135, 295–307. doi:10.1016/j.cell.2008.09.033
- Mukhopadhyay, J., Kapanidis, A.N., Mekler, V., Kortkhonjia, E., Ebright, Y.W., Ebright, R.H., 2001. Translocation of sigma(70) with RNA polymerase during transcription: fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA. *Cell* 106, 453–463.
- Mukhopadhyay, J., Sineva, E., Knight, J., Levy, R.M., Ebright, R.H., 2004. Antibacterial peptide microcin J25 inhibits transcription by binding within and obstructing the RNA polymerase secondary channel. *Mol. Cell* 14, 739–751. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.010
- Mulligan, M.E., Brosius, J., McClure, W.R., 1985. Characterization in vitro of the effect of spacer length on the activity of *Escherichia coli* RNA polymerase at the TAC promoter. *J. Biol. Chem.* 260, 3529–3538.

- Murakami, K.S., 2015. Structural Biology of Bacterial RNA Polymerase. *Biomol.* 2218-273X 5, 848–864. doi:10.3390/biom5020848
- Murakami, K.S., 2013. X-ray crystal structure of *Escherichia coli* RNA polymerase  $\sigma 70$  holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 288, 9126–9134. doi:10.1074/jbc.M112.430900
- Murakami, K.S., Darst, S.A., 2003. Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 31–39.
- Murakami, K.S., Masuda, S., Darst, S.A., 2002. Structural basis of transcription initiation: RNA polymerase holoenzyme at 4 Å resolution. *Science* 296, 1280–1284. doi:10.1126/science.1069594

## N

- Nahid, P., Pai, M., Hopewell, P.C., 2006. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3, 103–110. doi:10.1513/pats.200511-119JH
- Nedialkov, Y.A., Opron, K., Assaf, F., Artsimovitch, I., Kireeva, M.L., Kashlev, M., Cukier, R.I., Nudler, E., Burton, Z.F., 2013. The RNA polymerase bridge helix YFI motif in catalysis, fidelity and translocation. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 187–198. doi:10.1016/j.bbarm.2012.11.005
- Newton-Foot, M., Gey van Pittius, N.C., 2013. The complex architecture of mycobacterial promoters. *Tuberc. Edinb. Scotl.* 93, 60–74. doi:10.1016/j.tube.2012.08.003
- Nickels, B.E., Mukhopadhyay, J., Garrity, S.J., Ebright, R.H., Hochschild, A., 2004. The sigma 70 subunit of RNA polymerase mediates a promoter-proximal pause at the lac promoter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 544–550. doi:10.1038/nsmb757
- Nikaido, H., 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264, 382–388.

## O

- Olano, C., Gómez, C., Pérez, M., Palomino, M., Pineda-Lucena, A., Carbajo, R.J., Braña, A.F., Méndez, C., Salas, J.A., 2009. Deciphering biosynthesis of the RNA polymerase inhibitor streptolydigin and generation of glycosylated derivatives. *Chem. Biol.* 16, 1031–1044. doi:10.1016/j.chembiol.2009.09.015
- O'Neill, A., Oliva, B., Storey, C., Hoyle, A., Fishwick, C., Chopra, I., 2000. RNA polymerase inhibitors with activity against rifampin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3163–3166.
- Opperman, T., Richardson, J.P., 1994. Phylogenetic analysis of sequences from diverse bacteria with homology to the *Escherichia coli* rho gene. *J. Bacteriol.* 176, 5033–5043.
- Oppolzer, W., Prelog, V., Sensi, P., 1964. [The composition of rifamycin B and related rifamycins]. *Experientia* 20, 336–339.
- Osburne, M.S., Sonenshein, A.L., 1980. Inhibition by lipiarmycin of bacteriophage growth in *Bacillus subtilis*. *J. Virol.* 33, 945–953.

## P

- Paget, M.S.B., Helmann, J.D., 2003. The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol.* 4, 203.
- Panaghie, G., Aiyar, S.E., Bobb, K.L., Hayward, R.S., de Haseth, P.L., 2000. 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.* 299, 1217–1230.  
doi:10.1006/jmbi.2000.3808
- Parenti, F., Pagani, H., Beretta, G., 1975. Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes. I. Description of the producer strain and fermentation studies. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28, 247–252.
- Paul, B.J., Barker, M.M., Ross, W., Schneider, D.A., Webb, C., Foster, J.W., Gourse, R.L., 2004a. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* 118, 311–322. doi:10.1016/j.cell.2004.07.009
- Paul, B.J., Berkmen, M.B., Gourse, R.L., 2005. DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7823–7828. doi:10.1073/pnas.0501170102
- Paul, B.J., Ross, W., Gaal, T., Gourse, R.L., 2004b. rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 38, 749–770. doi:10.1146/annurev.genet.38.072902.091347
- Perdue, S.A., Roberts, J.W., 2011.  $\Sigma(70)$ -dependent transcription pausing in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 412, 782–792. doi:10.1016/j.jmb.2011.02.011
- Perederina, A., Svetlov, V., Vassylyeva, M.N., Tahirov, T.H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., Vassylyev, D.G., 2004. Regulation through the secondary channel—structural framework for ppGpp-DksA synergism during transcription. *Cell* 118, 297–309. doi:10.1016/j.cell.2004.06.030
- Peters, J.M., Mooney, R.A., Kuan, P.F., Rowland, J.L., Keles, S., Landick, R., 2009. Rho directs widespread termination of intragenic and stable RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15406–15411. doi:10.1073/pnas.0903846106
- Phagoburn: Evaluation of phage therapy for the treatment of burn wound infections [WWW Document], n.d. URL <http://www.phagoburn.eu/> (accessed 6.14.16).
- Plevani, P., Badaracco, G., Marmioli, N., Cassani, G., 1975. In vivo and in vitro effects of rifampicin and streptolydigin on transcription of *Kluyveromyces lactis* in the presence of nystatin. *Nucleic Acids Res.* 2, 239–255.
- Portrait, V., Gendron-Gaillard, S., Cottenceau, G., Pons, A.M., 1999. Inhibition of pathogenic *Salmonella enteritidis* growth mediated by *Escherichia coli* microcin J25 producing strains. *Can. J. Microbiol.* 45, 988–994.
- Potrykus, K., Cashel, M., 2008. (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 35–51. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162903
- Pronin, S.V., Martinez, A., Kuznedelov, K., Severinov, K., Shuman, H.A., Kozmin, S.A., 2011. Chemical synthesis enables biochemical and antibacterial evaluation of streptolydigin antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 12172–12184. doi:10.1021/ja2041964
- Proshkin, S., Rahmouni, R., Mironov, A., Nudler, E., 2010. Cooperation between Translating Ribosomes and RNA Polymerase in Transcription Elongation. *Science* 328, 504–508. doi:10.1126/science.1184939
- Pupov, D., Kuzin, I., Bass, I., Kulbachinskiy, A., 2014. Distinct functions of the RNA polymerase  $\sigma$  subunit region 3.2 in RNA priming and promoter escape. *Nucleic Acids Res.* 42, 4494–4504. doi:10.1093/nar/gkt1384
- Pupov, D., Miropolskaya, N., Sevostyanova, A., Bass, I., Artsimovitch, I., Kulbachinskiy, A., 2010. Multiple roles of the RNA polymerase {beta}' SW2 region in transcription initiation, promoter escape, and RNA elongation. *Nucleic Acids Res.* 38, 5784–5796. doi:10.1093/nar/gkq355

## R

- Raffaella, M., Kanin, E.I., Vogt, J., Burgess, R.R., Ansari, A.Z., 2005. Holoenzyme switching and stochastic release of sigma factors from RNA polymerase in vivo. *Mol. Cell* 20, 357–366. doi:10.1016/j.molcel.2005.10.011
- Ray, L., Yamanaka, K., Moore, B.S., 2015. A Peptidyl-Transesterifying Type I Thioesterase in Salinamide Biosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* doi:10.1002/anie.201508576
- Reppas, N.B., Wade, J.T., Church, G.M., Struhl, K., 2006. The transition between transcriptional initiation and elongation in *E. coli* is highly variable and often rate limiting. *Mol. Cell* 24, 747–757. doi:10.1016/j.molcel.2006.10.030
- Revyakin, A., Liu, C., Ebricht, R.H., Strick, T.R., 2006. Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. *Science* 314, 1139–1143. doi:10.1126/science.1131398
- Rhodium, V.A., Segall-Shapiro, T.H., Sharon, B.D., Ghodasara, A., Orlova, E., Tabakh, H., Burkhardt, D.H., Clancy, K., Peterson, T.C., Gross, C.A., Voigt, C.A., 2013. Design of orthogonal genetic switches based on a crosstalk map of  $\sigma_s$ , anti- $\sigma_s$ , and promoters. *Mol. Syst. Biol.* 9, 702. doi:10.1038/msb.2013.58
- Ring, B.Z., Yarnell, W.S., Roberts, J.W., 1996. Function of *E. coli* RNA polymerase sigma factor sigma 70 in promoter-proximal pausing. *Cell* 86, 485–493.
- Roghania, M., Zenkin, N., Yuzenkova, Y., 2015. Bacterial global regulators DksA/ppGpp increase fidelity of transcription. *Nucleic Acids Res.* 43, 1529–1536. doi:10.1093/nar/gkv003
- Rogozina, A., Zaychikov, E., Buckle, M., Heumann, H., 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. doi:10.1093/nar/gkp560
- Rosengren, K.J., Clark, R.J., Daly, N.L., Göransson, U., Jones, A., Craik, D.J., 2003. Microcin J25 has a threaded sidechain-to-backbone ring structure and not a head-to-tail cyclized backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 12464–12474. doi:10.1021/ja0367703
- Ross, W., Ernst, A., Gourse, R.L., 2001. Fine structure of *E. coli* RNA polymerase-promoter interactions: alpha subunit binding to the UP element minor groove. *Genes Dev.* 15, 491–506. doi:10.1101/gad.870001
- Ross, W., Gourse, R.L., 2005. Sequence-independent upstream DNA-alphaCTD interactions strongly stimulate *Escherichia coli* RNA polymerase-lacUV5 promoter association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 291–296. doi:10.1073/pnas.0405814102
- Ross, W., Vrentas, C.E., Sanchez-Vazquez, P., Gaal, T., Gourse, R.L., 2013. The Magic Spot: A ppGpp Binding Site on *E. coli* RNA Polymerase Responsible for Regulation of Transcription Initiation. *Mol. Cell* 50, 420–429. doi:10.1016/j.molcel.2013.03.021
- Rothstein, D.M., Hartman, A.D., Cynamon, M.H., Eisenstein, B.I., 2003. Development potential of rifalazil. *Expert Opin. Investig. Drugs* 12, 255–271. doi:10.1517/13543784.12.2.255
- Rothstein, D.M., van Duzer, J., Sternlicht, A., Gilman, S.C., 2007. Rifalazil and other benzoxazinorifamycins in the treatment of chlamydia-based persistent infections. *Arch. Pharm. (Weinheim)* 340, 517–529. doi:10.1002/ardp.200700080
- Ruff, E.F., Drennan, A.C., Capp, M.W., Poulos, M.A., Artsimovitch, I., Record, M.T., 2015. *E. coli* RNA Polymerase Determinants of Open Complex Lifetime and Structure. *J. Mol. Biol.* 427, 2435–2450. doi:10.1016/j.jmb.2015.05.024

Rymer, R.U., Solorio, F.A., Tehranchi, A.K., Chu, C., Corn, J.E., Keck, J.L., Wang, J.D., Berger, J.M., 2012. Binding mechanism of metal-NTP substrates and stringent-response alarmones to bacterial DnaG-type primases. *Struct. Lond. Engl.* 1993 20, 1478–1489. doi:10.1016/j.str.2012.05.017

## S

- Sable, S., Pons, A.M., Gendron-Gaillard, S., Cottenceau, G., 2000. Antibacterial activity evaluation of microcin J25 against diarrheagenic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4595–4597.
- Saecker, R.M., Record, M.T., Dehaseth, P.L., 2011. Mechanism of bacterial transcription initiation: RNA polymerase - promoter binding, isomerization to initiation-competent open complexes, and initiation of RNA synthesis. *J. Mol. Biol.* 412, 754–771. doi:10.1016/j.jmb.2011.01.018
- Sainsbury, S., Niesser, J., Cramer, P., 2013. Structure and function of the initially transcribing RNA polymerase II-TFIIB complex. *Nature* 493, 437–440. doi:10.1038/nature11715
- Salomón, R.A., Farías, R.N., 1995. The peptide antibiotic microcin 25 is imported through the TonB pathway and the SbmA protein. *J. Bacteriol.* 177, 3323–3325.
- Salomón, R.A., Farías, R.N., 1993. The FhuA protein is involved in microcin 25 uptake. *J. Bacteriol.* 175, 7741–7742.
- Salomón, R.A., Farías, R.N., 1992. Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174, 7428–7435.
- Samanta, S., Martin, C.T., 2013. Insights into the mechanism of initial transcription in *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 288, 31993–32003. doi:10.1074/jbc.M113.497669
- Sánchez-Hidalgo, M., Núñez, L.E., Méndez, C., Salas, J.A., 2010. Involvement of the beta subunit of RNA polymerase in resistance to streptolydigin and streptovaricin in the producer organisms *Streptomyces lydicus* and *Streptomyces spectabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1684–1692. doi:10.1128/AAC.01406-09
- Sarubbi, E., Monti, F., Corti, E., Miele, A., Selva, E., 2004. Mode of action of the microbial metabolite GE23077, a novel potent and selective inhibitor of bacterial RNA polymerase. *Eur. J. Biochem. FEBS* 271, 3146–3154. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04244.x
- Schmieder, R., Edwards, R., 2012. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol.* 7, 73–89. doi:10.2217/fmb.11.135
- Schroeder, L.A., Choi, A.-J., DeHaseth, P.L., 2007. The -11A of promoter DNA and two conserved amino acids in the melting region of sigma70 both directly affect the rate limiting step in formation of the stable RNA polymerase-promoter complex, but they do not necessarily interact. *Nucleic Acids Res.* 35, 4141–4153. doi:10.1093/nar/gkm431
- Schwartz, E.C., Shekhtman, A., Dutta, K., Pratt, M.R., Cowburn, D., Darst, S., Muir, T.W., 2008. A full-length group 1 bacterial sigma factor adopts a compact structure incompatible with DNA binding. *Chem. Biol.* 15, 1091–1103. doi:10.1016/j.chembiol.2008.09.008
- Sclavi, B., Zaychikov, E., Rogozina, A., Walther, F., Buckle, M., 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. doi:10.1073/pnas.0408218102
- Scott, L.J., 2013. Fidaxomicin: a review of its use in patients with Clostridium difficile infection. Drugs 73, 1733–1747. doi:10.1007/s40265-013-0134-z
- Sen, R., Nagai, H., Hernandez, V.J., Shimamoto, N., 1998. Reduction in abortive transcription from the lambdaPR promoter by mutations in region 3 of the sigma70 subunit of Escherichia coli RNA polymerase. J. Biol. Chem. 273, 9872–9877.
- Sensi, P., Greco, A.M., Ballotta, R., 1959. Rifomycin. I. Isolation and properties of rifomycin B and rifomycin complex. Antibiot. Annu. 7, 262–270.
- Sergio, S., Piralì, G., White, R., Parenti, F., 1975. Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes III. Mechanism of action. J. Antibiot. (Tokyo) 28, 543–549.
- Severinov, K., 2000. RNA polymerase structure-function: insights into points of transcriptional regulation. Curr. Opin. Microbiol. 3, 118–125.
- Severinov, K., Soushko, M., Goldfarb, A., Nikiforov, V., 1993. Rifampicin region revisited. New rifampicin-resistant and streptolydigin-resistant mutants in the beta subunit of Escherichia coli RNA polymerase. J. Biol. Chem. 268, 14820–14825.
- Sharma, U.K., Chatterji, D., 2010. Transcriptional switching in Escherichia coli during stress and starvation by modulation of sigma activity. FEMS Microbiol. Rev. 34, 646–657. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00223.x
- Sharp, M.M., Chan, C.L., Lu, C.Z., Marr, M.T., Nechaev, S., Merritt, E.W., Severinov, K., Roberts, J.W., Gross, C.A., 1999. The interface of sigma with core RNA polymerase is extensive, conserved, and functionally specialized. Genes Dev. 13, 3015–3026.
- Shaw, K.J., Rather, P.N., Hare, R.S., Miller, G.H., 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol. Rev. 57, 138–163.
- Siddhikol, C., Erbstoesser, J.W., Weisblum, B., 1969. Mode of action of streptolydigin. J. Bacteriol. 99, 151–155.
- Singh, S.S., Typas, A., Hengge, R., Grainger, D.C., 2011. Escherichia coli  $\sigma^{70}$  senses sequence and conformation of the promoter spacer region. Nucleic Acids Res. 39, 5109–5118. doi:10.1093/nar/gkr080
- Skordalakes, E., Berger, J.M., 2003. Structure of the Rho transcription terminator: mechanism of mRNA recognition and helicase loading. Cell 114, 135–146.
- Smith, A.B., Dong, S., Brenneman, J.B., Fox, R.J., 2009. Total synthesis of (+)-sorangicin A. J. Am. Chem. Soc. 131, 12109–12111. doi:10.1021/ja906115a
- Sonenshein, A.L., 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., Fisher, S.H., 1977. Lipiarmycin-resistant ribonucleic acid polymerase mutants of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 132, 73–79.
- Sonenshein, A.L., Cami, B., Brevet, J., Cote, R., 1974. Isolation and characterization of rifampin-resistant and streptolydigin-resistant mutants of Bacillus subtilis with altered sporulation properties. J. Bacteriol. 120, 253–265.
- Srivastava, A., Talaue, M., Liu, S., Degen, D., Ebright, R.Y., Sineva, E., Chakraborty, A., Druzhinin, S.Y., Chatterjee, S., Mukhopadhyay, J., Ebright, Y.W., Zozula, A., Shen, J., Sengupta, S., Niedfeldt, R.R., Xin, C., Kaneko, T., Irschik, H., Jansen, R., Donadio, S., Connell, N., Ebright, R.H., 2011. New target for inhibition of bacterial RNA polymerase: “switch region.” Curr. Opin. Microbiol. 14, 532–543. doi:10.1016/j.mib.2011.07.030

- Srivatsan, A., Wang, J.D., 2008. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 100–105. doi:10.1016/j.mib.2008.02.001
- Sullivan, K.M., Spooner, L.M., 2010. Fidaxomicin: a macrocyclic antibiotic for the management of *Clostridium difficile* infection. *Ann. Pharmacother.* 44, 352–359. doi:10.1345/aph.1M351
- Swanson, R.N., Hardy, D.J., Shipkowitz, N.L., Hanson, C.W., Ramer, N.C., Fernandes, P.B., Clement, J.J., 1991. In vitro and in vivo evaluation of tiacumicins B and C against *Clostridium difficile*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35, 1108–1111.

## T

- Tan, L., Ma, D., 2008. Total synthesis of salinamide A: a potent anti-inflammatory bicyclic depsipeptide. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47, 3614–3617. doi:10.1002/anie.200800397
- Tang, W., Liu, S., Degen, D., Ebright, R.H., Prusov, E.V., 2014. Synthesis and evaluation of novel analogues of ripostatins. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 20, 12310–12319. doi:10.1002/chem.201403176
- Tare, P., Mallick, B., Nagaraja, V., 2013. Co-evolution of specific amino acid in sigma 1.2 region and nucleotide base in the discriminator to act as sensors of small molecule effectors of transcription initiation in mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 90, 569–583. doi:10.1111/mmi.12384
- Tehranchi, A.K., Blankschien, M.D., Zhang, Y., Halliday, J.A., Srivatsan, A., Peng, J., Herman, C., Wang, J.D., 2010. The transcription factor DksA prevents conflicts between DNA replication and transcription machinery. *Cell* 141, 595–605. doi:10.1016/j.cell.2010.03.036
- Temiakov, D., Zenkin, N., Vassilyeva, M.N., Perederina, A., Tahirov, T.H., Kashkina, E., Savkina, M., Zorov, S., Nikiforov, V., Igarashi, N., Matsugaki, N., Wakatsuki, S., Severinov, K., Vassilyev, D.G., 2005. Structural basis of transcription inhibition by antibiotic streptolydigin. *Mol. Cell* 19, 655–666.
- Theriault, R.J., Karwowski, J.P., Jackson, M., Girolami, R.L., Sunga, G.N., Vojtko, C.M., Coen, L.J., 1987. Tiacumicins, a novel complex of 18-membered macrolide antibiotics. I. Taxonomy, fermentation and antibacterial activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* 40, 567–574.
- Tomsic, M., Tsujikawa, L., Panaghie, G., Wang, Y., Azok, J., deHaseth, P.L., 2001. Different roles for basic and aromatic amino acids in conserved region 2 of *Escherichia coli* sigma(70) in the nucleation and maintenance of the single-stranded DNA bubble in open RNA polymerase-promoter complexes. *J. Biol. Chem.* 276, 31891–31896. doi:10.1074/jbc.M105027200
- Touloukhonov, I., Landick, R., 2006. The role of the lid element in transcription by *E. coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 361, 644–658. doi:10.1016/j.jmb.2006.06.071
- Trautinger, B.W., Jaktaji, R.P., Rusakova, E., Lloyd, R.G., 2005. RNA polymerase modulators and DNA repair activities resolve conflicts between DNA replication and transcription. *Mol. Cell* 19, 247–258. doi:10.1016/j.molcel.2005.06.004
- Traxler, M.F., Summers, S.M., Nguyen, H.-T., Zacharia, V.M., Hightower, G.A., Smith, J.T., Conway, T., 2008. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 68, 1128–1148. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06229.x

- Trischman, J.A., Tapiolas, D.M., Jensen, P.R., Dwight, R., Fenical, W., McKee, T.C., Ireland, C.M., Stout, T.J., Clardy, J., 1994. Salinamides A and B: anti-inflammatory depsipeptides from a marine streptomyces. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 757–758. doi:10.1021/ja00081a042
- Tupin, A., Gualtieri, M., Leonetti, J.-P., Brodolin, K., 2010a. The transcription inhibitor lipiarmycin blocks DNA fitting into the RNA polymerase catalytic site. *EMBO J.* 29, 2527–2537. doi:10.1038/emboj.2010.135
- Tupin, A., Gualtieri, M., Roquet-Banères, F., Morichaud, Z., Brodolin, K., Leonetti, J.-P., 2010b. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 519–523. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.017
- Tuske, S., Sarafianos, S.G., Wang, X., Hudson, B., Sineva, E., Mukhopadhyay, J., Birktoft, J.J., Leroy, O., Ismail, S., Clark, A.D., Dharia, C., Napoli, A., Laptenko, O., Lee, J., Borukhov, S., Ebright, R.H., Arnold, E., 2005. Inhibition of bacterial RNA polymerase by streptolydigin: stabilization of a straight-bridge-helix active-center conformation. *Cell* 122, 541–552. doi:10.1016/j.cell.2005.07.017
- Typas, A., Becker, G., Hengge, R., 2007. The molecular basis of selective promoter activation by the sigmaS subunit of RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* 63, 1296–1306. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05601.x

## U

- Uptain, S.M., Kane, C.M., Chamberlin, M.J., 1997. Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 117–172. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.117

## V

- Vassilyev, D.G., 2009. Elongation by RNA polymerase: a race through roadblocks. *Curr. Opin. Struct. Biol., Catalysis and regulation / Proteins* 19, 691–700. doi:10.1016/j.sbi.2009.10.004
- Vassilyev, D.G., Sekine, S., Laptenko, O., Lee, J., Vassilyeva, M.N., Borukhov, S., Yokoyama, S., 2002. Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* 417, 712–719. doi:10.1038/nature752
- Vassilyev, D.G., Svetlov, V., Vassilyeva, M.N., Perederina, A., Igarashi, N., Matsugaki, N., Wakatsuki, S., Artsimovitch, I., 2005. Structural basis for transcription inhibition by tagetitoxin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1086–1093. doi:10.1038/nsmb1015
- Vassilyev, D.G., Vassilyeva, M.N., Perederina, A., Tahirov, T.H., Artsimovitch, I., 2007. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature* 448, 157–162. doi:10.1038/nature05932
- Villain-Guillot, P., Gualtieri, M., Bastide, L., Leonetti, J.-P., 2007a. In vitro activities of different inhibitors of bacterial transcription against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3117–3121. doi:10.1128/AAC.00343-07

- Villain-Guillot, P., Gualtieri, M., Bastide, L., Roquet, F., Martinez, J., Amblard, M., Pugniere, M., Leonetti, J.-P., 2007b. Structure-activity relationships of phenyl-furanyl-rhodanines as inhibitors of RNA polymerase with antibacterial activity on biofilms. *J. Med. Chem.* 50, 4195–4204. doi:10.1021/jm0703183
- Voskuil, M.I., Chambliss, G.H., 2002. The TRTGn motif stabilizes the transcription initiation open complex. *J. Mol. Biol.* 322, 521–532.
- Vuthoori, S., Bowers, C.W., McCracken, A., Dombroski, A.J., Hinton, D.M., 2001. Domain 1.1 of the sigma(70) subunit of Escherichia coli RNA polymerase modulates the formation of stable polymerase/promoter complexes. *J. Mol. Biol.* 309, 561–572. doi:10.1006/jmbi.2001.4690

## W

- Waksman, S.A., Woodruff, H.B., 1942. Selective Antibiotic Action of Various Substances of Microbial Origin. *J. Bacteriol.* 44, 373–384.
- Waksman, S.A., Woodruff, H.B., 1940. The Soil as a Source of Microorganisms Antagonistic to Disease-Producing Bacteria. *J. Bacteriol.* 40, 581–600.
- Waldburger, C., Gardella, T., Wong, R., Susskind, M.M., 1990. Changes in conserved region 2 of Escherichia coli sigma 70 affecting promoter recognition. *J. Mol. Biol.* 215, 267–276.
- Walker, K.A., Osuna, R., 2002. Factors affecting start site selection at the Escherichia coli fis promoter. *J. Bacteriol.* 184, 4783–4791.
- Wang, D., Bushnell, D.A., Westover, K.D., Kaplan, C.D., Kornberg, R.D., 2006. Structural basis of transcription: role of the trigger loop in substrate specificity and catalysis. *Cell* 127, 941–954. doi:10.1016/j.cell.2006.11.023
- Washburn, R.S., Gottesman, M.E., 2015. Regulation of Transcription Elongation and Termination. *Biomol.* 2218-273X 5, 1063–1078. doi:10.3390/biom5021063
- Wegrzyn, A., Szalewska-Pałasz, A., Błaszczak, A., Liberek, K., Wegrzyn, G., 1998. Differential inhibition of transcription from sigma70- and sigma32-dependent promoters by rifampicin. *FEBS Lett.* 440, 172–174.
- Wigneshweraraj, S., Bose, D., Burrows, P.C., Joly, N., Schumacher, J., Rappas, M., Pape, T., Zhang, X., Stockley, P., Severinov, K., Buck, M., 2008. Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the sigma54 promoter-specificity factor. *Mol. Microbiol.* 68, 538–546. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06181.x
- Wilson, C., Dombroski, A.J., 1997. Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by Escherichia coli RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 267, 60–74. doi:10.1006/jmbi.1997.0875
- Wilson, K.-A., Kalkum, M., Ottesen, J., Yuzenkova, J., Chait, B.T., Landick, R., Muir, T., Severinov, K., Darst, S.A., 2003. Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 12475–12483. doi:10.1021/ja036756q

## X

- Xiao, Y., Li, S., Niu, S., Ma, L., Zhang, G., Zhang, H., Zhang, G., Ju, J., Zhang, C., 2011. Characterization of tiacumicin B biosynthetic gene cluster affording diversified tiacumicin analogues and revealing a tailoring dihalogenase. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 1092–1105. doi:10.1021/ja109445q

## Y

- Yang, X., Lewis, P.J., 2010. The interaction between bacterial transcription factors and RNA polymerase during the transition from initiation to elongation. *Transcription* 1, 66–69. doi:10.4161/trns.1.2.12791
- Young, B.A., Anthony, L.C., Gruber, T.M., Arthur, T.M., Heyduk, E., Lu, C.Z., Sharp, M.M., Heyduk, T., Burgess, R.R., Gross, C.A., 2001. A coiled-coil from the RNA polymerase beta' subunit allosterically induces selective nontemplate strand binding by sigma(70). *Cell* 105, 935–944.
- Young, B.A., Gruber, T.M., Gross, C.A., 2004. Minimal machinery of RNA polymerase holoenzyme sufficient for promoter melting. *Science* 303, 1382–1384. doi:10.1126/science.1092462
- Young, B.A., Gruber, T.M., Gross, C.A., 2002. Views of transcription initiation. *Cell* 109, 417–420.
- Yuzenkova, J., Delgado, M., Nechaev, S., Savalia, D., Epshtein, V., Artsimovitch, I., Mooney, R.A., Landick, R., Farias, R.N., Salomon, R., Severinov, K., 2002. Mutations of bacterial RNA polymerase leading to resistance to microcin j25. *J. Biol. Chem.* 277, 50867–50875. doi:10.1074/jbc.M209425200
- Yuzenkova, Y., Bochkareva, A., Tadigotla, V.R., Roghanian, M., Zorov, S., Severinov, K., Zenkin, N., 2010. Stepwise mechanism for transcription fidelity. *BMC Biol.* 8, 54. doi:10.1186/1741-7007-8-54
- Yuzenkova, Y., Roghanian, M., Bochkareva, A., Zenkin, N., 2013. Tagetitoxin inhibits transcription by stabilizing pre-translocated state of the elongation complex. *Nucleic Acids Res.* 41, 9257–9265. doi:10.1093/nar/gkt708
- Yuzenkova, Y., Tadigotla, V.R., Severinov, K., Zenkin, N., 2011. A new basal promoter element recognized by RNA polymerase core enzyme. *EMBO J.* 30, 3766–3775. doi:10.1038/emboj.2011.252

## Z

- Zenkin, N., Kulbachinskiy, A., Yuzenkova, Y., Mustaev, A., Bass, I., Severinov, K., Brodolin, K., 2007. Region 1.2 of the RNA polymerase sigma subunit controls recognition of the -10 promoter element. *EMBO J.* 26, 955–964. doi:10.1038/sj.emboj.7601555
- Zenkin, N., 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. doi:10.1073/pnas.0400886101
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., Darst, S.A., 1999. Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution. *Cell* 98, 811–824.
- Zhang, Y., Degen, D., Ho, M.X., Sineva, E., Ebright, K.Y., Ebright, Y.W., Mekler, V., Vahedian-Movahed, H., Feng, Y., Yin, R., Tuske, S., Irschik, H., Jansen, R., Maffioli, S., Donadio, S.,

- Arnold, E., Ebright, R.H., 2014. GE23077 binds to the RNA polymerase “i” and “i+1” sites and prevents the binding of initiating nucleotides. *eLife* 3, e02450. doi:10.7554/eLife.02450
- Zhang, Y., Feng, Y., Chatterjee, S., Tuske, S., Ho, M.X., Arnold, E., Ebright, R.H., 2012. Structural basis of transcription initiation. *Science* 338, 1076–1080. doi:10.1126/science.1227786
- Zhilina, E.V., Miropolskaya, N.A., Bass, I.A., Brodolin, K.L., Kulbachinskiy, A.V., 2011. Characteristics of  $\sigma$ -dependent pausing by RNA polymerases from *Escherichia coli* and *Thermus aquaticus*. *Biochem. Biokhimiia* 76, 1098–1106. doi:10.1134/S0006297911100038
- Zorov, S., Yuzenkova, Y., Nikiforov, V., Severinov, K., Zenkin, N., 2014. Antibiotic streptolydigin requires noncatalytic Mg<sup>2+</sup> for binding to RNA polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 1420–1424. doi:10.1128/AAC.02248-13
- Zuo, Y., Steitz, T.A., 2015. Crystal structures of the *E. coli* transcription initiation complexes with a complete bubble. *Mol. Cell* 58, 534–540. doi:10.1016/j.molcel.2015.03.010
- Zuo, Y., Wang, Y., Steitz, T.A., 2013. The mechanism of *E. coli* RNA polymerase regulation by ppGpp is suggested by the structure of their complex. *Mol. Cell* 50, 430–436. doi:10.1016/j.molcel.2013.03.020